

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÉGULATEURS TRANSCRIPTIONNELS DES GÈNES *AtMAX* ET *AtBRC1*
CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA*

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

PIERRE-OLIVIER GAGNÉ

OCTOBRE 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier mon Prof. François Ouellet pour tous ses judicieux conseils durant la maîtrise.

Merci à ma famille et amis pour leur support moral.

Merci à l'équipe de laboratoire du côté végétal à l'UQAM pour toute l'aide apportée durant tout ce temps.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|------|
| LISTE DES FIGURES..... | v |
| LISTE DES TABLEAUX..... | vi |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS..... | vii |
| RÉSUMÉ | viii |
| CHAPITRE I | |
| REVUE DE LITTÉRATURE..... | 1 |
| 1.1 Introduction | 1 |
| 1.2 Les auxines | 3 |
| 1.3 Les cytokinines | 6 |
| 1.4 Gènes associés à la perception et à la transmission de signal des auxines | 6 |
| 1.5 Les strigolactones et les gènes <i>AtMAX</i> | 10 |
| 1.6 Le gène <i>BRANCHED1</i> | 15 |
| 1.7 Les gènes MADS-box | 16 |
| 1.8 Modèle de contrôle de la ramification | 18 |
| 1.9 Objectifs de l'étude présente | 21 |
| CHAPITRE II | |
| MATÉRIELS ET MÉTHODES..... | 22 |
| 2.1 Analyses des régions promotrices | 22 |
| 2.2 Préparation de bactéries compétentes | 22 |
| 2.3 Clonages et analyses moléculaires | 24 |
| 2.4 Production des protéines recombinantes | 28 |
| 2.5 Immunobuvardage de type western | 31 |
| 2.6 Gels de retardement | 32 |
| CHAPITRE III | |
| RÉSULTATS | 35 |
| 3.1 Analyse des régions promotrices et 5' UTR | 35 |

| | | |
|--|---|----|
| 3.2 | Expression des protéines recombinantes AtAP1 et AtFUL | 44 |
| 3.3 | Purification des protéines AtAP1, AtFUL et TaVRN1 | 47 |
| 3.4 | Analyses de retard sur gel | 54 |
| CHAPITRE IV | | |
| DISCUSSION | | 60 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES FUTURES | | 71 |
| RÉFÉRENCES..... | | 73 |

LISTE DES FIGURES

| Figure | Page |
|---|------|
| 1.1 Transport polaire des auxines | 5 |
| 1.2 Synthèse des strigolactones à partir de caroténoïdes par la voie <i>MAX</i> | 12 |
| 1.3 Modèle du contrôle hormonal de la ramification chez <i>Arabidopsis</i> | 14 |
| 3.1. Région promotrice et 5'UTR du gène <i>APETALA1</i> chez <i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>AtAPI</i>) | 37 |
| 3.2 Région promotrice et 5'UTR du gène <i>BRANCHED1</i> chez <i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>AtBRC1</i>) | 38 |
| 3.3 Région promotrice et 5'UTR du gène <i>MORE AXILLARY BRANCHING 2</i> chez <i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>AtMAX2</i>) | 39 |
| 3.4 Région promotrice et 5'UTR du gène <i>MORE AXILLARY BRANCHING 4</i> chez <i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>AtMAX4</i>) | 40 |
| 3.5 Motifs CArG normaux et mutés, des régions promotrices et 5'UTR des gènes <i>AtAPI</i> , <i>AtBRC1</i> et <i>AtMAX4</i> | 42 |
| 3.6 Vérification des sondes CArG utilisées dans mon étude | 43 |
| 3.7 Expression des protéines recombinantes <i>AtAPI</i> et <i>AtFUL</i> | 46 |
| 3.8 Expression des protéines recombinantes <i>AtAPI</i> et <i>AtFUL</i> du peptide de fusion de pTrcHis et de la protéine de contrôle d'expression TaADF..... | 50 |
| 3.9 Purification des protéines recombinantes <i>AtAPI</i> , <i>AtFUL</i> et TaVRN1 par chromatographie sur colonne NiNTA en conditions natives (A) et dénaturantes (B) | 53 |
| 3.10 Retard sur gel des liaisons de TaVRN1 aux différents motifs CArG trouvés dans les régions promotrices et 5'UTR des gènes <i>AtMAX4</i> , <i>AtAPI</i> et <i>AtBRC1</i> | 56 |
| 3.11 Retard sur gel des liaisons de <i>AtAPI</i> aux différents motifs CArG trouvés dans les régions promotrices et 5'UTR des gènes <i>AtMAX4</i> , <i>AtAPI</i> et <i>AtBRC1</i> | 58 |

LISTE DES TABLEAUX

| Tableau | Page |
|---|------|
| 2.1 Oligonucléotides utilisés dans cette étude..... | 25 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|---------|--|
| AP1 | APETALA1 |
| Aux/Iaa | "AUXINE/INDOLE-3-ACETIC ACID" |
| AXR1 | "AUXIN RESISTANT 1 (AXR1)" |
| BRC1 | "BRANCHED1" |
| CAL | "CAULIFLOWER" |
| CK | cytokinine |
| EMSA | "Electrophoretic Mobility Shift Assay" ou analyse de retard de migration sur gel |
| FUL | "FRUITFUL" |
| MADS | MCM1, AGAMOUS, DEFICIENS et SERUM RESPONSE FACTOR |
| MAX | "MORE AXILLARY BRANCHING" |
| PIN | "PIN-FORMED AUXIN EFFLUX CARRIERS" |
| PLACE | "PLant cis ACting regulatory Elements" |
| SL | strigolactone |
| TB1 | "TEOSINTE BRANCHED1" |
| VRN1 | "VERNALIZATION1" |

RÉSUMÉ

Les régulateurs de croissance et facteurs environnementaux régulent le développement et la croissance des plantes, ce qui affecte la biomasse et le rendement des cultures. Un déterminant important de la biomasse est l'étendue de la ramification, c'est-à-dire l'élongation des branches latérales. Les strigolactones (SL), des régulateurs de croissance dérivés de caroténoïdes et produits de la voie *MORE AXILLARY BRANCHING* (*MAX*), sont des régulateurs négatifs du développement des bourgeons axillaires. Les gènes *AtMAX1* à *AtMAX4* chez *Arabidopsis* codent pour des protéines impliquées dans la synthèse et la régulation de ces molécules. Parallèlement, une autre protéine, nommée *BRANCHED1* (*BRC1*), est impliquée dans l'arrêt du développement des bourgeons, et il a été suggéré que son action se trouvait en aval de la voie *MAX*. D'autre part, une étude récente a démontré que l'expression constitutive du gène *TRITICUM AESTIVUM VERNALIZATION1* (*TaVRN1*) du blé chez *Arabidopsis* affecte la ramification. Ce gène code pour un facteur de transcription à boîte MADS (MADS-box). *TaVRN1* se lie à des motifs CArG de la région promotrice de *AtMAX4*, et provoque une augmentation de l'expression de *AtMAX4*. *TaVRN1* fait partie du clade *APETALA1/SQUAMOSA*, tout comme les gènes *APETALA1* (*AtAPI*), *FRUITFUL* (*AtFUL*) et *CAULIFLOWER* (*AtCAL*) chez la plante-modèle *Arabidopsis thaliana*, toutefois seul le membre *AtAPI* de ce clade est surexprimé en présence de *TaVRN1*. Dans ce travail, nous avons procédé à une analyse détaillée des régions promotrices des gènes *AtBRC1*, *AtMAX2* et *AtMAX4*, ainsi que du gène codant pour le MADS-box *AtAPI*. Cette analyse nous a permis d'identifier de nombreux éléments de régulation situés dans la région proximale des promoteurs (800 pb), dont des motifs CArG et CArG consensus chez *AtBRC1* et *AtMAX4* auxquels nous avons porté une attention particulière. Des analyses de gels de retardement effectuées avec des sondes contenant ces CArG et avec les protéines recombinantes *AtAPI*, *AtFUL*, et *TaVRN1* (comme contrôle) indiquent qu'*AtAPI* et *TaVRN1* ont la capacité de se lier aux différents motifs CArG et CArG consensus des gènes *AtAPI*, *AtBRC1* et *AtMAX4*. Ceci suggère qu'*AtAPI* est un orthologue de *TaVRN1* chez *Arabidopsis*. Nos résultats suggèrent aussi qu'*AtAPI* est un FT MADS ayant la capacité de s'autoréguler et de moduler l'expression des gènes *AtMAX4* et *AtBRC1*. Ces gènes étant impliqués dans le développement des branches latérales, ceci suggère que la dominance apicale est un phénomène qui dépend de facteurs de régulation MADS et plus spécifiquement d'*AtAPI*.

Mots clés: *Arabidopsis thaliana*, *APETALA1*, bourgeons axillaires, *BRANCHED1*, branches latérales, croissance, développement, dominance apicale, MADS, *MAX*, motif CArG

CHAPITRE I

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Introduction

Les plantes sont une composante vitale du régime alimentaire mondial. Le rendement des récoltes en agriculture est intimement lié à la masse foliaire et/ou à la quantité de graines produites. La biomasse est en corrélation directe avec l'architecture des plantes, celle-ci étant hautement dépendante du niveau de ramification, c'est-à-dire du nombre de branches latérales se développant sur la tige principale. Qui plus est, la floraison, les ramifications et ultimement la biomasse dépendent d'événements associés à la transition du stade végétatif au stade reproductif. La biomasse produite pour une plante donnée s'avère, de toute évidence, un facteur économique important.

La croissance et le développement de la plante nécessitent une coordination entre des événements endogènes qui s'exercent à la fois aux niveaux intra- et intercellulaire. Les contrôles intracellulaires sont représentés par des modifications de l'expression des gènes qui influencent les activités cellulaires. Les contrôles intercellulaires concernent en particulier les hormones et le rôle qu'elles jouent dans l'inhibition ou l'activation de la ramification. Les modifications de l'expression des gènes et les activités hormonales sont des événements importants induits en réponse à des stimuli environnementaux. Toutefois, on ne connaît pas le mode d'intervention de ces événements dans le processus de ramification.

Afin de s'assurer des meilleures conditions de croissance, le développement des plantes durant le stade végétatif est régi par la dominance apicale. Vers des stades plus tardifs, la plante amorce un développement de ses branches latérales. Les

méristèmes ayant préalablement participé au développement végétatif des parties aériennes sont convertis en méristèmes floraux et la floraison débute. Bien que les méristèmes axillaires aient le même potentiel de développement que le méristème primaire de la croissance apicale, ces derniers ne forment fréquemment que quelques feuilles avant de former des bourgeons axillaires dormants (McSteen et Leyser, 2005). Au niveau structural, dans le cas où l'inflorescence se développe à l'apex de la tige, le méristème apical passe de la phase végétative à la phase reproductive. Dans les autres cas, les méristèmes floraux se forment à l'aisselle des feuilles, à partir des méristèmes axillaires. Or, les bourgeons qui donnent naissance aux branches demeurent souvent dormants, entre autres à cause de la dominance apicale. Ainsi, l'auxine et les strigolactones sont les hormones qui inhibent le développement des bourgeons dormants, ce qui réduit le niveau de ramification. Inversement, la cytokinine est une hormone qui favorise leur développement. C'est le ratio entre les différentes hormones qui détermine s'il y aura activation ou inhibition du développement des bourgeons dormants.

Récemment, une nouvelle voie métabolique contrôlant négativement la croissance des bourgeons axillaires et le niveau de ramification, appelée la voie *MAX* (pour *MORE AXILLARY BRANCHING*), a été identifiée chez *Arabidopsis* (McSteen et Leyser, 2005). La mutation de l'un ou l'autre des gènes *AtMAX1*, *AtMAX2*, *AtMAX3* ou *AtMAX4* résulte en des plantes ayant une ramification augmentée (Booker et al., 2005).

Dernièrement, des études ont démontré que l'expression ectopique du gène de blé *TaVRN1* chez *Arabidopsis* accélère la floraison et modifie l'architecture de la plante (Adam et al., 2007). Ce gène appartient au clade *APETALA1* et *SQUAMOSA* (*API1/SQUA*) et code pour un facteur de transcription à boîte MADS (Danyluk et al., 2003). Le phénotype des plantes indique que la surexpression de *TaVRN1* accélère la

floraison et suggère qu'elle pourrait diminuer la dominance apicale. Les analyses moléculaires ont montré que l'expression du gène *TaVRN1* cause une surexpression du gène *AtAPI* et du gène de régulation hormonale *AtMAX4*. Il a été suggéré que la surexpression de *TaVRN1* puisse modifier indirectement le ratio auxine : cytokinine pour induire la croissance des méristèmes latéraux (Adam et al., 2007). Ceci se traduit par le développement des branches et des ramifications latérales, ce qui provoque l'augmentation de la biomasse et dans plusieurs cas, l'augmentation en nombre des fleurs et des graines. L'orthologue de *TaVRN1* chez *Arabidopsis* n'a cependant pas été identifié et ses interacteurs restent à déterminer. Qui plus est, le gène *BRANCHED 1* (*AtBRC1*; décrit plus loin), récemment découvert, a été reconnu comme jouant un rôle important dans la dominance apicale de par son action inhibitrice sur le développement des bourgeons axillaires, et son action est en aval de celle de la voie *MAX*. Contrairement aux gènes *AtMAX*, *AtBRC1* est exprimé dans les bourgeons. Comme l'auxine ne s'accumule pas dans les bourgeons, il reste donc à identifier les intermédiaires qui transmettent le signal des auxines et des strigolactones aux bourgeons dormants.

1.2 Les auxines

Les auxines sont des hormones ayant un noyau indole et une chaîne acétique. Bien qu'il existe d'autres auxines naturelles tel que l'acide-3-indolebutyrique et l'acide phénylacétique, l'acide indole-3-acétique (IAA) est la plus abondante des types d'auxines chez les plantes. L'IAA est synthétisée principalement dans l'apex des tiges et dans les jeunes feuilles en croissance (Ljung et al., 2001). Ceci signifie qu'enlever l'apex d'une plante par décapitation enlève la source majeure d'auxine, ce qui favorisera le développement des branches latérales. Après leur synthèse, elles sont transportées dans les cellules du phloème et uniquement dans le sens basipétal de l'apex vers la base (Figure 1.1). Une différence de pH entre l'espace pariétal cellulaire

et le cytoplasme permet de maintenir le gradient de concentration de l'IAA et permet d'entretenir son transport dans la cellule.

Même si la nature hydrophobe, donc lipophile, du groupement indole de l'IAA permet des associations avec la surface de la membrane plasmique, la charge négative du groupement carboxyle ionisé empêche l'IAA de traverser la membrane. Seule la forme non-ionisée de l'IAA peut entrer dans les cellules par diffusion passive à travers la membrane plasmique sans l'aide d'un transporteur. La possibilité de diffuser passivement dans la membrane dépend du pH. Chez les plantes, le pH apoplastique est approximativement de 5,5 en raison du transport actif de protons par les protéines transmembranaires H^+ -ATPases. À ce pH, les molécules d'IAA sont en équilibre à approximativement 83% ionisée et 17% non-ionisée. Or, dans le cytoplasme des cellules de plantes, le pH est approximativement de 7. Cette différence de pH provoque une accumulation dans la cellule de la forme ionisée de l'auxine, qui ne traverse que difficilement la membrane cellulaire. Son passage nécessite donc des transporteurs d'efflux. Ceux-ci sont situés à la base de la cellule, ce qui maintient la direction du transport (Jones, 1998).

Principalement synthétisée dans le méristème apical et les jeunes feuilles, les auxines sont transportées aux autres parties de la plante et aux racines par de nombreux transporteurs. Ceux-ci incluent les facilitateurs d'influx AUXIN INFLUX CARRIER PROTEIN1 (AUX1)/LIKE-AUX, p-GLYCOPROTEIN AUXIN EFFLUX CARRIERS, et PIN-FORMED AUXIN EFFLUX CARRIERS (PIN) (Blakeslee et al., 2005; Paponov et al., 2005; Geisler et Murphy, 2006). Ce transport basipétal des auxines provoque la croissance en hauteur de la plante et inhibe le développement des bourgeons axillaires, phénomène que l'on appelle dominance apicale (Ljung et al., 2001). Toutefois, des études récentes ont montré que la croissance initiale des bourgeons axillaires suite à une décapitation n'est pas en relation directe avec une

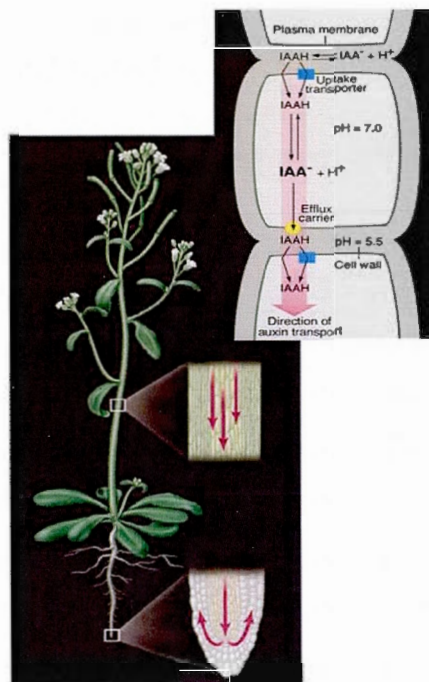


Figure 1.1. Transport polaire des auxines. La polarité dans la tige est due au fait que les transporteurs d'influx (« uptake transporters ») sont en haut de la cellule alors que les transporteurs d'efflux (« efflux carriers ») sont en bas (Jones, 1998).

diminution de la concentration d'auxine dans la tige principale puisque le déplacement des auxines s'effectue trop lentement (1 cm/h) pour être la cause directe du développement initial de bourgeons situé à plusieurs centimètres du lieu de décapitation. Ainsi, des expériences avec de l'auxine radiomarquée ont montré que le développement des bourgeons axillaires, suite à une décapitation, débute avant qu'un changement de la concentration d'auxine au niveau de ces bourgeons ait pu se produire (Ferguson et Beveridge, 2009). D'autres analyses ont permis de déterminer que l'auxine introduite apicalement n'entre pas dans les bourgeons (Prasad et al., 1993). En fait, les niveaux d'auxine dans les bourgeons n'augmentent graduellement que lorsque les bourgeons s'activent. Ceci n'est peut-être pas surprenant étant donné que l'apex des tiges actives est prolifique dans la synthèse d'auxine. Qui plus est, l'application directe d'auxine dans le bourgeon n'inhibe pas la croissance de celui-ci.

Ceci signifie que l'auxine se déplaçant dans la tige doit agir indirectement pour inhiber le développement des bourgeons axillaires (Ongaro et Leyser, 2008)

1.3 Les cytokinines

Une autre classe d'hormone impliquée dans la ramification regroupe les cytokinines (CK) (Ongaro et Leyser, 2008). Chez les plantes supérieures, trois types de cytokinines sont considérées comme cytokinines principales : l'isopentenyladénine, la zéatine, et la dihydrozéatine. Contrairement à l'action inhibitrice indirecte des auxines, les CKs induisent directement la croissance du bourgeon en favorisant la division cellulaire. D'ailleurs, l'auxine inhibe la biosynthèse des CKs via le gène *AUXIN RESPONSE1 (AXR1)* qui code pour une protéine F-box agissant en amont de la transduction du signal de l'auxine (Nordstrom et al., 2004; Tanaka et al., 2006).

Au niveau des bourgeons, des études récentes montrent que la stimulation de la croissance par la CK serait induite par la répression de la transcription de *AtBRC1*, qui code pour un facteur de transcription impliqué dans la répression de la croissance des bourgeons (Braun et al., 2012). D'ailleurs, la CK appliquée de manière exogène induit la croissance des bourgeons, et la concentration en CK augmente dans les bourgeons au fur et à mesure qu'ils s'activent (Ongaro et Leyser, 2008).

1.4 Gènes associés à la perception et à la transmission de signal des auxines

Gènes *Aux/IAA*, *ARF* et *TIR1*

L'action de l'auxine est régulée par deux grandes familles de gènes bien connus : *AUXINE/INDOLE-3-ACETIC ACID (Aux/IAA)* et *AUXINE RESPONSE FACTOR (ARF)*. Les protéines ARF fonctionnent comme facteurs de transcription

(activation/répression) de gènes qui influencent le développement et la croissance. Les protéines Aux/IAA préviennent l'action de l'auxine en se liant aux protéines ARF, ce qui inhibe leur action sur la transcription. Par la médiation du *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1 (TIR1)*, l'auxine permet la dégradation des protéines de répression Aux/IAA et réactive la transcription dépendante des protéines ARF (Salmon et al., 2008). Les protéines ARF se lient à une séquence d'ADN (AuxRE; "auxin-response element") des gènes-cibles et activent ou répriment leur transcription (Dharmasiri et Estelle, 2002).

Gènes *AXR* et *AFB*

La concentration d'auxine dans la plante est aussi contrôlée par les gènes *AUXIN RESISTANT 1 (AXR1)* et *AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEIN (AFB)*. Le gène *AXR1* est impliqué dans le transport polaire de l'auxine. La protéine AXR1 module la dégradation de protéines régulatrices par l'ubiquitine. Une répression d'*AXR1* résulte en une perte de sensibilité à l'IAA (Stirnberg et al., 1999). Les gènes *AFB* (1, 2 et 3) codent pour des protéines F qui s'assemblent dans des complexes SCF. Des analyses génétiques ont montré que *TIR1* et les gènes *AFB* ont des fonctions partiellement redondantes, soit de récepteurs d'auxine appartenant à la famille des protéines F, qui agiraient comme intermédiaires dans la régulation de la transcription médiée par l'auxine (Dharmasiri et al., 2005). L'augmentation de la concentration en auxines au niveau des racines agit négativement sur la synthèse des cytokinines, ce qui limite les niveaux de ces dernières au niveau des bourgeons. Le ratio élevé auxines/cytokinines provoque l'inhibition du développement des bourgeons axillaires.

Gènes *PIN* et *ABC*

La famille de gènes *PIN* comporte, chez *Arabidopsis*, 8 protéines de transport (*PIN1* à 8), lesquelles sont subdivisées en deux sous-groupes caractérisés par une différence dans la boucle au milieu de leur chaîne polypeptidique. On dénote alors les *PIN* réguliers "longs", comprenant les *PIN* 1 à 4 et 7, et les *PIN* "courts" comprenant les *PIN* 5, 6 et 8 (Zazimalova et al., 2007; Krecek et al., 2009; Zazimalova et al., 2013). Les *PIN* 1, 2, 3, 4 et *PIN* 7 ont une localisation majoritairement polaire sur la membrane plasmique. Cette localisation définit la direction du débit de l'auxine (Petrasek et al., 2006; Zazimalova et al., 2013). Cependant, même si leur emplacement sur la membrane plasmique est principalement polaire, les protéines *PIN* 1, 2, 3, 4 et 7 ne sont pas statiques. Au contraire, les protéines *PIN* se déplacent entre la membrane plasmique et les compartiments de l'endosome (Zazimalova et al., 2007), et peuvent être rapidement relocalisées à différentes parties de la cellule par un mécanisme de type transcytose (Kleine-Vehn et al., 2008) en réponse notamment à des signaux environnementaux. Pour ce qui est des *PIN* 5, 6 et 8, celles-ci ne sont pas impliquées dans le transport polaire, agissant plutôt localement, tel que sur la membrane du reticulum endoplasmique pour *PIN5* (Mravec et al., 2009). Chez *Arabidopsis*, *PIN1* apparaît comme particulièrement importante dans le transport polaire des auxines dans la tige principale, puisqu'une perte de fonction de ce gène entraîne une réduction substantielle du transport d'auxine. Son expression est stimulée par la protéine *COP1* en fonction de la lumière (Zazimalova et al., 2013). En concordance avec ce rôle, la protéine *PIN1* est localisée à la base des cellules parenchymateuses du phloème. Pour sa part, la protéine *PIN2* est exprimée dans les tissus épidermiques et corticaux des racines et son transport est influencé par la protéine *PINOID*. Elle redirige le flux d'auxine de la racine principale vers les racines secondaires pour favoriser leur division et leur élongation cellulaire (Benjamins et al., 2001; Titapiwatanakun et al., 2009). Des études récentes montrent que ces

redirections seraient en réponse au phototropisme par le biais de la voie de signalisation du récepteur de lumière bleue PHOTOTROPIN1 et de la protéine signal NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL3. PIN3 se retrouve dans le tissu columellaire des racines et son transport est influencé par le gravitropisme (Friml et al., 2002). Elle participe à la rétention de l'auxine dans le transport vasculaire conjointement avec ABCB19 (Titapiwatanakun et al., 2009). PIN4 est située dans le centre pré-vasculaire quiescent et est responsable de la structure du méristème des racines (Friml et al., 2002). Pour ce qui est de PIN5, PIN6 et PIN8, celles-ci sont impliquées dans le transport intracellulaire de l'auxine. PIN5 est impliquée dans le transport du cytosol vers le lumen du RE (Mravec et al., 2009). PIN6, située dans les nectaires latéraux de la plante, est impliquée dans le transport d'auxines menant à la sécrétion de nectar (Bender et al., 2013). PIN8 est localisée dans les gamètes mâles de la plante et sa fonction demeure inconnue (Dal Bosco et al., 2012; Dal Bosco et al., 2012). Enfin, PIN7 est située dans les tissus épidermiques et est impliquée dans le transport acropétal (Lewis et al., 2011). Ainsi, l'établissement du flux polaire apex-base embryonnaire de l'auxine est médié exclusivement par PIN1, 2, 3, 4 et 7 (Zazimalova et al., 2013).

La superfamille des gènes ABC code pour des transporteurs ATP binding cassette (ABC). Ces transporteurs, plus particulièrement ceux du type B (ABCB/ multidrug resistance/phosphoglycoprotein), sont associés avec le déplacement d'une grande variété de molécules, de nutriments et de xénobiotiques (Verrier et al., 2008). De ces transporteurs, ABCB1, 4 et 19 ont pour fonction principale le transport d'efflux de l'auxine avec une haute spécificité (Titapiwatanakun et al., 2009). Les protéines ABCB1, 4, et 19 sont des transporteurs stables qui ne démontrent généralement pas de polarité dans la membrane plasmique, bien que certaines cellules contiennent ces protéines dans des zones plus localisées, permettant de contribuer à des fonctions tissulaires spécifiques. ABCB4 est un transporteur d'influx de l'auxine lorsque le

niveau d'auxine est faible, puis devient un transporteur d'efflux de l'auxine lorsque la concentration d'auxine augmente. Dans certains cas, il a été démontré que les PINs et ABCBs fonctionnent ensemble (Yang et Murphy, 2009).

1.5 Les strigolactones et les gènes *AtMAX*

Dans le but d'étudier le développement et l'architecture de la plante *Arabidopsis thaliana*, une approche de génétique directe a permis d'identifier les gènes *MORE AXILLARY BRANCHING (MAX)* (Figure 1.2) (Umehara et al., 2008). Il a été démontré qu'une perte de fonction à n'importe quel des loci *AtMAX1*, *AtMAX2*, *AtMAX3* ou *AtMAX4* engendre une ramification plus prononcée que la ramification du plant sauvage (WT). Qui plus est, pour *max1-1*, *max3-1* (et *max3-9*) et *max4-1*, le phénotype mutant peut être restauré au phénotype sauvage par greffe d'une partie de racine ou de tige, suggérant que ces mutants sont déficients en un inhibiteur de ramification transmissible (Stirnberg et al., 2002; Sorefan et al., 2003; Booker et al., 2004; Booker et al., 2005). Cet inhibiteur s'est révélé être une classe de composés nommés strigolactones.

Les strigolactones sont des phytohormones dérivées de caroténoïdes ayant une structure de 19 atomes de carbones contenant une lactone tricyclique jointe par un pont éno-éther à une seconde lactone. Produites par les racines de plantes, les strigolactones inhibent la ramification. Un haut taux d'embranchement est d'ailleurs observé chez les lignées mutantes des gènes *AtMAX1*, *AtMAX3*, *AtMAX4* et *AtD27* (Sorefan et al., 2003; Foo et al., 2005; Ishikawa et al., 2005; Johnson et al., 2006; Bainbridge et al., 2008) suggérant que les strigolactones agiraient comme second messenger pour inhiber la croissance des bourgeons, ce qui est en accord avec le modèle proposé précédemment (Ferguson et Beveridge, 2009; Agusti et al., 2011). L'application de GR24, un analogue synthétique des strigolactones, aux mutants *max*

et *Atd27* rétablit le phénotype au type sauvage. La voie de synthèse des strigolactones à partir de la b-carotène chez *Arabidopsis* fait intervenir les protéines MAX (Umehara et al., 2008) ainsi que certaines protéines AtDWARF (Alder et al., 2012; Waters et al., 2012). Ainsi, la protéine AtD27, une isomérase, convertit le tout-*trans*-b-carotène en 9-*cis*-b-carotène. Ce composé est ensuite clivé en 9-*cis*-b-apo-10'-caroténal par la CCD7, puis la CCD8 incorpore trois atomes d'oxygène à cette molécule pour former la carlactone. Ce composé est structuellement similaire aux strigolactones, contenant le même nombre d'atomes de carbone ainsi qu'un groupement lactone, et a une activité biologique similaire aux strigolactones. Bien que la conversion de la carlactone en strigolactone n'ait pas encore été élucidée, il a été déterminé récemment que le gène de riz *DWARF14* (*OsD14*) (Waters et al., 2012), codant pour une protéine membre de la superfamille des a/b-hydrolase, est requise dans le contrôle de la ramification strigolactone-dépendante et agit dans la même voie de signalisation que les autres gènes de signalisation reliés aux strigolactones. Dans cette étude, l'analyse du mutant *Atd14-1*, une lignée mutante de l'orthologue de *DWARF14* chez *Arabidopsis*, montre qu'*Atd14-1* a une ramification augmentée similaire au phénotype de *max2* et qu'il est insensible à GR24. Ainsi, lors de la floraison, quelques bourgeons axillaires à la base des feuilles de rosettes s'activent et poussent pour former des ramifications secondaires. Ceci signifie que, comme AtMAX2, AtD14 est nécessaire pour une transduction du signal des strigolactones (Waters et al., 2012).

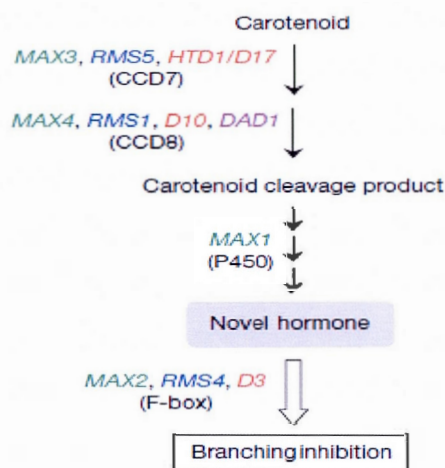


Figure 1.2. Synthèse des strigolactones ("novel hormone") à partir de caroténoïdes par la voie MAX (Umehara et al., 2008).

Des analyses de doubles mutants ainsi que des greffes réciproques avec *max1-1*, *max2-1*, *max3-9* et *max4-1* ont démontré que les quatre gènes interagissent dans la même voie métabolique, où *AtMAX1*, *AtMAX3* et *AtMAX4* sont nécessaires à la synthèse et *AtMAX2* à la régulation de l'activité des strigolactones. Les résultats du greffage réciproque suggèrent que *AtMAX1* agit sur un intermédiaire mobile en aval de *AtMAX3* et *AtMAX4*, lesquels sont prédits avoir des substrats immobiles. Suite à ces analyses, il a été déterminé que tous les gènes de la voie MAX chez *Arabidopsis* ont été identifiés (Figure 1.2) (Stirnberg et al., 2002; Sorefan et al., 2003; Booker et al., 2004; Booker et al., 2005). *AtMAX3* (At2g44990) a été identifié comme la dioxygénase CCD7 clivant les caroténoïdes plastidiques (Booker et al., 2004; Auldrige et al., 2006). Il a été démontré que la protéine *AtMAX3*, exprimée chez *E. coli*, peut cliver une gamme de caroténoïdes (Booker et al., 2004; Schwartz et al., 2004). *AtMAX4* (At4g32810) code pour CCD8, sensiblement divergente de *AtMAX3* (Sorefan et al., 2003). *AtMAX4* exprimée chez *E. coli* démontre une activité CCD (Auldrige et al., 2006) et est capable de cliver un des produits résultant du clivage de caroténoïdes par *AtMAX3* (Schwartz et al., 2004). *AtMAX1* (At2g26170) code pour un membre appartenant à la classe III de la famille des cytochromes P450s, et le

substrat de cette classe est souvent généré par des dioxygénases. Ceci est en accord avec la position proposée pour *AtMAX1*, soit en aval de *AtMAX3* et *AtMAX4*, dans la synthèse d'une substance inhibant la ramification. Finalement, *AtMAX2* (At2g42620), aussi connu sous l'appellation ORE9, appartient à la famille de protéines à boîte-F (F-box) ayant des répétitions riches en leucines (LRR) (Woo et al., 2001). Les membres de cette famille agissent comme sous-unité de sélection de substrat pour l'ubiquitine-protéine ligase de complexe SCF (pour "SKP, CULLIN, F-box containing complex", soit une protéine E3 multimérique à doigt RING), qui catalyse la polyubiquitination spécifique de protéines, les marquant habituellement pour leur dégradation par le protéasome 26S (Ciechanover et al., 2000; Stirnberg et al., 2007). Cette fonction biochimique probable est aussi compatible avec l'action prédite de ce gène dans la transmission du signal des strigolactones.

Des analyses de double mutants et de greffage réciproque effectuées chez le pois et le pétunia ont permis de démontrer une orthologie entre certains membres des familles de gènes *MAX* (*Arabidopsis*), *RMS* (pois) et *DAD* (pétunia) (Figure 1.2). Plus particulièrement, *AtMAX4* est un orthologue de *RMS1* et *DAD1*, tandis que *AtMAX3* est un orthologue de *RMS5*, et possiblement *DAD3* (Sorefan et al., 2003; Foo et al., 2005; Snowden et al., 2005; Johnson et al., 2006; Simons et al., 2007). *AtMAX2* est un orthologue de *RMS4*, mais le pois possède un second gène, *RMS3*, prédit pour agir dans la transmission du signal des strigolactones (Beveridge et al., 1996; Johnson et al., 2006). Pour le pétunia, le mutant prédit dans la transmission du signal, *dad2*, n'affecte pas les homologues du pétunia correspondant aux gènes *AtMAX2/RMS4*. Une hypothèse est donc que *DAD2* soit un orthologue de *RMS3* (Simons et al., 2007). Jusqu'à présent, il n'y a pas de mutation chez le pois ou le pétunia indiquant l'existence d'un homologue de *AtMAX1* chez ces espèces, et il n'existe pas de mutant de ramification chez *Arabidopsis* équivalent à *rms3* ou *dad2*. Récemment, des mutations dans le riz pour des orthologues de *AtMAX3/RMS5* et *AtMAX2/RMS4* ont

été décrites comme résultant en une augmentation du tallage, suggérant que la voie *MAX* est largement conservée, au moins dans les plantes à graines (Ishikawa et al., 2005; Zou et al., 2006). Qui plus est, des recherches dans les bases de données ont révélé des gènes étroitement liés dans tout le règne végétal (Ongaro et Leyser, 2008).

Il y a une relation entre les gènes *MAX* et l'auxine puisque les bourgeons de mutants *max* montrent une résistance à l'effet inhibiteur de l'auxine apical (Ongaro et Leyser, 2008). En plus de montrer plus de ramifications latérales, les mutants *max* montrent une augmentation de la capacité du transport d'auxine dans la tige par la modulation de *PIN1*, impliquant que les bourgeons dormants sont capables d'exporter l'auxine et poursuivre leur développement (Ongaro et Leyser, 2008). La capacité du transport d'auxine dans la tige du haut vers le bas semble donc régulée par la voie *MAX* (Figure 3).

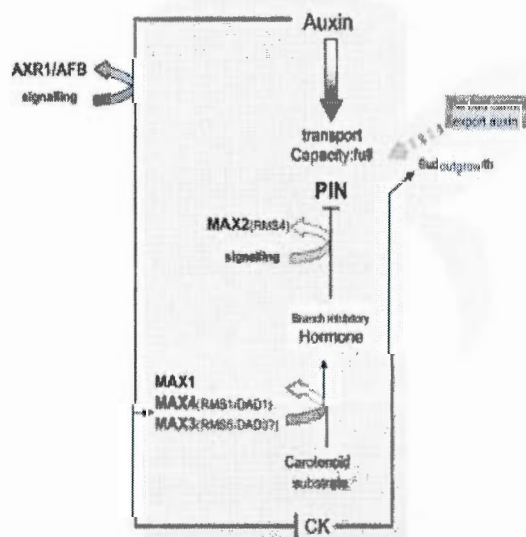


Figure 1.3. Modèle du contrôle hormonal de la ramification chez *Arabidopsis* (Ongaro et Leyser, 2008).

1.6 Le gène *BRANCHED1*

Un autre gène, nommé *BRANCHED1* (*BRC1*) et aussi connu sous le nom de *TCPI2* de la famille de gènes *TB1/CYC*, *CIN* et *PCF* (*TCP*), est un facteur de transcription impliqué dans l'arrêt du développement des bourgeons. Une étude a démontré que la famille de gènes *TCP* est similaire au gène *TEOSINTE BRANCHED1* (*TB1*) retrouvé chez les monocotylédones. *AtBRC1* est exprimé dans les bourgeons en développement (Aguilar-Martinez et al., 2007). Cette étude démontre que *AtBRC1* répond aux stimuli environnementaux tels que la densité de culture, la durée d'ensoleillement et la décapitation. Le gène est exprimé différemment chez les mutants *max* en réponse au stade développemental de la plante, soit plus particulièrement la floraison. De plus, *AtBRC1* est requis dans la dominance apicale sans être régulé significativement par la voie *AXR1*-dépendante, puisqu'un haut niveau d'auxine, des mutations d'*AXR1* ou un haut niveau de cytokinines n'affecte pas sa transcription. Il a été suggéré que son action se trouvait en aval de la voie *MAX*, puisque les mutants *max* ont un niveau d'ARNm *AtBRC1* plus faible comparativement au type sauvage. Des analyses d'hybridation *in situ* ont confirmé la localisation de l'expression de *AtBRC1* et sa répression lors de l'élongation des branches latérales. Des analyses de localisation cellulaire ont démontré que *BRC1* se situe directement dans les noyaux, supportant son rôle de régulateur transcriptionnel.

Récemment, des études chez le pois (*Pisum sativum*) ont montré que la strigolactone stimule le niveau de transcription du gène *PsBRC1*. De plus, cette même étude montre que les cytokinines agissent aussi sur la transcription de *AtBRC1*, en réprimant celle-ci. Il a été suggéré que *AtBRC1* pourrait intégrer les voies de signalisation des cytokinines et strigolactones au niveau transcriptionnel, toutefois son mode d'action demeure inconnu (Braun et al., 2012).

1.7 Les gènes MADS-box

Les gènes MADS-box jouent divers rôles importants dans le réseau de gènes qui contrôlent le développement de la plante. L'acronyme MADS fait référence aux quatre protéines à la base de la découverte du domaine MADS, soit **MCMI**, **AGAMOUS**, **DEFICIENS** et **SERUM RESPONSE FACTOR**. Le domaine MADS est un motif d'attachement ADN hautement conservé dans l'évolution qui se retrouve dans tous les organismes vivants. Les gènes MADS exercent de nombreuses fonctions. Certains sont impliqués dans la promotion ou la répression de la transition florale, dépendamment des facteurs internes ou environnementaux (tels que l'âge de la plante, le froid, l'ensoleillement). Ces gènes exercent leur fonction en influençant les gènes d'identité du méristème, qui contrôlent la différenciation des méristèmes floraux. De plus, plusieurs études suggèrent que des membres de cette famille de gènes jouent un rôle dans le développement végétatif des plantes, soit lors du développement des embryons, des racines ou des feuilles. L'existence de gènes MADS chez les gymnospermes, les fougères et les mousses, qui ne font pas de fleurs ou de fruits, montre que le rôle de ces gènes chez les plantes ne se limite pas à la fleur ou au développement des fruits, mais peut aussi influencer la structure et le développement, soit notamment en agissant sur la ramification des plantes (Becker et al., 2003).

Chez *Arabidopsis*, quatre voies génétiques font la promotion de la floraison : (i) les gènes *CONSTANS* (*CO*) et *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) agissent sur la voie de la photopériode, (ii) la vernalisation et la voie autonome favorisent la transition florale par une répression du gène *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) et une augmentation de l'expression du gène *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO* (*SOC1*); (iii) l'acide gibbérélique, hormone de croissance, induit la floraison en augmentant le niveau de transcription du gène identitaire du méristème floral *LEAFY* (*LFY*); et (iv)

FT, *SOC1* et *LFY* induisent le gène identitaire du méristème floral *API* qui induit la formation de méristèmes floraux. Parmi ces gènes de transition florale, *FLC*, *SOC1* et *API* appartiennent à la famille des gènes MADS. *SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*) et *AGAMOUS-like 24* (*AGL24*) impliqués dans la régulation du temps de floraison, ainsi que *CAULIFLOWER* (*CAL*) et *FRUITFUL* (*FUL*) associés au développement floral, sont d'autres exemples de cette famille de gènes (Danyluk et al., 2003; de Folter et al., 2005; de Folter et Angenent, 2006; Adam et al., 2007).

Le gène *TaVRN1*, qui est un membre de la sous-famille *API*, code pour un facteur de transcription MADS. C'est un gène clé dans le contrôle positif de la transition de la phase végétative à la phase reproductive chez le blé. Une étude récente sur l'expression constitutive du gène *TaVRN1* chez *Arabidopsis* a démontré que celui-ci accélère la floraison et exerce un effet apparent sur l'architecture de la plante, soit sur la dominance apicale (Adam et al., 2007). Ces observations suggèrent que *TaVRN1* a une influence sur l'expression des gènes *AXR* et/ou *MAX*. Cette même étude a montré que *AtMAX4* est surexprimé dans les plantes qui présentent une perte de dominance apicale (ramification augmentée). *De facto*, les plantes qui expriment *AtMAX4* ectopiquement possèdent le même phénotype que les plantes qui n'expriment pas *AtMAX4* (Booker et al., 2005). En corrolaire, il a été rapporté que la surexpression de *AtMAX4* chez *Arabidopsis* ne mène pas à un effet phénotypique majeur et que la surexpression d'autres composants de la voie *MAX* ou en aval de celle-ci sont requis pour réprimer la croissance des bourgeons.

Parmi les gènes testés, seuls *AtMAX4* et *AtAPI* ont montré un niveau d'expression plus élevé chez les plantes surexprimant *TaVRN1*. L'augmentation de l'expression de *AtAPI* et de *AtMAX4* dans les plantes d'*Arabidopsis* surexprimant *TaVRN1* suggère que le facteur de transcription *TaVRN1* peut interagir physiquement avec les promoteurs de *AtAPI* et de *AtMAX4* pour déclencher l'accumulation des transcrits

correspondants. Le promoteur d'*AtAPI* contient un motif CArG, l'élément *cis* lié par les facteurs de transcription MADS, dans la région proximale de 1700 pb en amont du site prédit d'initiation de la transcription. Des expériences de retard sur gel (EMSAs, pour electrophoretic mobility shift assays) ont révélé que TaVRN1 lie spécifiquement ce motif CArG. Le promoteur de *AtMAX4* contient quatre motifs CArG dans la région proximale de 1700 pb en amont du site prédit d'initiation de la transcription. Une analyse EMSA a démontré que TaVRN1 se lie aux motifs CArG1 et CArG4 mais ne se lie pas aux motifs CArG2 et CArG3. Ces résultats montrent que la protéine TaVRN1 exprimée ectopiquement pourrait agir comme activateur transcriptionnel de l'expression des gènes *AtAPI* et *AtMAX4* chez *Arabidopsis* (Adam et al., 2007).

Étant donné que le gène *TaVRN1* du blé fait partie du clade AP1/SQUA, tout comme les gènes *AtAPI*, *AtFUL* et *AtCAL*, ceci suggère que l'un ou l'autre de ces derniers pourrait être l'orthologue de *TaVRN1* chez *Arabidopsis*.

1.8 Modèle de contrôle de la ramification

Actuellement, deux modèles sont présentement proposés pour expliquer la ramification des plantes supérieures. Dans un premier temps, puisque les auxines ne se présentent pas en grande quantité dans les bourgeons axillaires, il a été suggéré que l'inhibition de leur croissance résulte de la modulation d'un messager secondaire que sont probablement les strigolactones. Les auxines se déplaçant via le transport polaire d'auxine régulent positivement la biosynthèse des strigolactones, qui se déplacent alors acropétalement aux bourgeons pour réprimer leur croissance (Brewer et al., 2009). Dans ce modèle, les strigolactones agissent localement et, conséquemment, l'application de strigolactones aux bourgeons inhibe leur développement.

Un second modèle propose que les strigolactones agissent en modulant le transport d'auxine (Bainbridge et al., 2008; Prusinkiewicz et al., 2009). Ainsi, le transport polaire des auxines inhibe l'activation des bourgeons en empêchant l'établissement d'un transport d'auxines hors des bourgeons vers la tige principale, étape présumée requise pour le développement des bourgeons. Supportant cette hypothèse, il existe une corrélation entre le potentiel de transport d'auxines dans les branches, la polarisation de PIN dans les tiges axillaires et le développement des branches (Prusinkiewicz et al., 2009). L'exportation d'auxines par les feuilles émergentes à l'apex de la plante vers la tige principale est susceptible de procéder par canalisation des auxines en induisant la translocalisation des transporteurs polaires d'auxines (Prusinkiewicz et al., 2009). Un flux initial d'auxines d'une "source" vers un "puits" est régulé positivement par rétrocontrôle pour établir une rangée de cellules contenant une grande quantité de protéines PIN polarisées. Ces rangées de cellules servent alors de conduit pour le transport d'auxines et peuvent subséquemment se différencier en une sorte de vascularisation (Sauer et al., 2006). Ce flux normal est maintenu par les strigolactones. Quand il y a moins de strigolactones venant des racines, il y aurait augmentation de protéines PIN1 (situées à la base des cellules). Ceci favorise une augmentation de la vitesse de transport d'auxines dans la tige, ce qui crée un "appel" qui cause la sortie des auxines du bourgeon. Comme il y a moins d'auxines, le ratio auxines/cytokinines diminue et il est probable que les cytokinines favorisent l'élongation. Supportant cette idée, des analyses ont montré que les lignées mutantes *max1* et *max4* de la voie de synthèse des strigolactones ont une ramification augmentée, une accumulation plus importante de PINs ainsi qu'un transport polaire d'auxines augmenté. L'ajout de faibles doses de l'inhibiteur de transport d'auxine acide naphthylphthalamique (NPA) restaure les lignées mutantes au phénotype sauvage de manière MAX2-dépendante (Crawford et al., 2010). Supportant l'idée que les strigolactones transduisent la réponse des auxines, des expérimentations sur des bourgeons excisés de la tige et cultivés sur agar ont montré que bien que les auxines

seules inhibent et GR24 seul n'inhibe pas le développement de bourgeons, le mélange GR24 et auxines inhibe beaucoup plus le développement des bourgeons (Crawford et al., 2010). Enfin des études chez le pois (*Pisum sativum*) sur la protéine PsBRC1, un orthologue de AtBRC1, suggère que ce facteur de transcription agit localement dans les bourgeons axillaires en aval des strigolactones pour réprimer la croissance des bourgeons. L'étude comparative de mutants *rms1*, *rms2* et *rms4* suggère que les strigolactones agiraient localement dans les bourgeons axillaires par le biais du gène *PsBRC1* en stimulant le niveau de transcription de celui-ci. De plus, cette même étude montre que les cytokinines agissent aussi sur l'expression de *AtBRC1* en réprimant celui-ci. Ainsi, AtBRC1 pourrait intégrer la voie de signalisation des cytokinines et strigolactones au niveau transcriptionnel (Braun et al., 2012).

Qui plus est, des études chez *Arabidopsis* avaient montré par le passé que AtBRC1 agit à l'intérieur des bourgeons en développement pour promouvoir l'arrêt de croissance. Ainsi, la stimulation de AtBRC1 mène à une inhibition de la ramification des plantes, alors qu'une répression de AtBRC1 mène au développement des bourgeons (Aguilar-Martinez et al., 2007). Le rôle intégrateur de AtBRC1 signifie que les deux modes de contrôle de croissance pourraient agir de concert. Il est probable qu'un tel type de mécanisme entre auxines, strigolactones et CKs assure un développement homéostatique de la ramification de la plante en contrôlant le développement des bourgeons axillaires. Ainsi, l'identification et la caractérisation des facteurs endogènes qui influencent le niveau de ramification est de première importance car ceci permettra de développer les outils moléculaires pour sélectionner les variétés les mieux adaptées pour la croissance dans des régions géographiques particulières, tel que des régions où le temps de culture est limité, ou pour des régions où la surface de culture est limitée. Ceci améliorera le rendement de ces cultures, ce qui aura un impact économique important.

1.9 Objectifs de l'étude présente

Dans ce travail, nous avons procédé à une analyse détaillée des régions promotrices des gènes *AtBRC1*, *AtMAX2* et *AtMAX4*, ainsi que du gène codant pour le FT MADS *AtAP1*. Cette analyse nous a permis d'identifier de nombreux éléments de régulation situés dans la région proximale des promoteurs (800 pb), dont des motifs CArG et CArG consensus chez *AtBRC1* et *AtMAX4* auxquels nous avons porté une attention particulière. Les protéines AtAP1 et AtFUL, chez *Arabidopsis*, appartenant au même clade que TaVRN1 soit le clade AP1/SQUA et ayant déjà montré un effet sur la ramification (Adam et al., 2007), j'ai fait des analyses de retard de migration sur gel électrophorétique pour montrer qu'AtAP1 serait l'orthologue de TaVRN1 et le régulateur transcriptionnel de *AtMAX4* et *AtBRC1* chez *Arabidopsis*.

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Analyses des régions promotrices

Les régions promotrices de *AtMAX2* (AT2G42620.1) et *AtBRC1* (AT3G18550.1) (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>; consulté avril 2013) ont été analysées en utilisant Signal Scan et la base de données PLACE (pour PLAnt Cis-acting regulatory Elements, <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>; consulté avril 2013) afin d'indiquer la présence et la localisation d'éléments *cis*, soit plus particulièrement des motifs CArG qui sont des sites de liaison de facteurs de transcription à boîte MADS. PLACE est une banque de données de motifs (séquences de nucléotides) de plantes présents généralement dans les promoteurs et qui sont reconnus par des FT pour réguler la transcription. Ces motifs ont été répertoriés à partir de différentes publications et revues d'articles portant sur les régions régulatrices de différents gènes de plantes. En plus des motifs originaux, certaines variations chez d'autres gènes ou chez d'autres espèces de plantes y sont compilées (Prestridge, 1991; Higo et al., 1999).

2.2 Préparation de bactéries compétentes

Préparation de bactéries chimiocompétentes *E. coli* DH10B

Des bactéries *E. coli* DH10B ont été mises en culture sur pétri LB agar/streptomycine (25 µg/mL) puis incubées à 37°C pendant 16 heures. Ensuite, 6 mL de LB/streptomycine (25 µg/mL) a été inoculé avec une colonie et incubé à 37°C pendant 16 heures avec agitation. De cette culture, 5 mL a servi à inoculer 250 mL de LSLB (5 g de Bacto tryptone, 2,5 g d'extrait de levure et 2,5g de

NaCl)/streptomycine (25 µg/mL), qui a été incubé à 37°C avec agitation jusqu'à DO₆₀₀ de 0,6. La culture de bactéries a alors été mise sur glace 20 minutes, puis centrifugée à 4000g à 4°C pour 15 minutes. Le surnageant a été jeté et les bactéries ont été resuspendues doucement sur glace dans 80 mL de tampon CCMB80 (10 mM acétate de potassium pH 7,0, 80 mM CaCl₂, 20 mM MnCl₂, 10 mM MgCl₂ et glycérol 10%) puis incubées sur glace 20 minutes. Les bactéries ont ensuite été centrifugées à 4000g à 4°C pour 15 minutes, puis le surnageant a été jeté et les bactéries ont été resuspendues dans 20 mL de tampon CCMB80 et incubées sur glace 20 minutes. Les bactéries ont alors été centrifugées à nouveau à 4000g à 4°C pour 15 minutes, resuspendues dans 5 mL de tampon CCMB80 puis aliquotées par 90 µL, pour être ensuite congelées sur glace sèche et entreposées à -80°C.

Préparation de bactéries électrocompétentes *E. coli* TOP10

Des bactéries *E. coli* TOP10 ont été mises en culture sur pétri LB Agar/streptomycine (25 µg/mL) puis incubées à 37°C 16 heures. Ensuite, 6 mL de LB/streptomycine (25 µg/mL) a été inoculé avec une colonie et incubé à 37°C pendant 16 heures avec agitation. Cette culture a ensuite été utilisée pour inoculer 500 mL de LSLB. Les bactéries ont alors été incubées à 37°C avec agitation jusqu'à une DO₆₀₀ de 0,8 puis, les bactéries ont été refroidies sur glace pour 20 minutes. Ensuite, les bactéries ont été centrifugées à 4000g à 4°C pour 15 minutes. Le surnageant a été jeté et les bactéries ont été resuspendues doucement dans 500 mL de glycérol 10% préalablement refroidi. Après centrifugation à 4000g à 4°C pour 15 minutes, les bactéries ont été resuspendues doucement dans 20 mL de glycérol 10% préalablement refroidi. Après une dernière centrifugation à 4000g à 4°C pour 15 minutes, les bactéries ont été resuspendues doucement dans 2 mL de glycérol 10%. Celles-ci ont alors été aliquotées par 40 µL puis congelées sur glace sèche et entreposées à -80°C.

2.3 Clonages et analyses moléculaires

Les ADNc des régions codantes de *AtAPI* (AT1G69120.1) et de *AtFUL* (AT5G60910.1) ont été obtenus des clones U20604 et U16143 commandés au *Arabidopsis* Biological Resource Center (Ohio State University). Les clones ont été mis sur pétri LB/kanamycine (25 µg/mL) où une colonie a été prélevée après 16 h d'incubation à 37°C pour être resuspendue dans du LB liquide/kanamycine (25 µg/mL). Après 16 h d'incubation avec agitation à 37°C, les cultures ont été centrifugées à 14 000g et les plasmides ont été récupérés par mini-préparation sur colonne de terre diatomée (Carter et Milton, 1993; Machesky, 1996). Une analyse de restriction a été effectuée. Le clone U20604 a été digéré avec NotI, BstBI, BglII et NotI + BglII, alors que le clone U16143 a été digéré EcoRV, XbaI, HincII, HincII + XbaI et EcoRV + XbaI dans les tampons NEB appropriés, selon les recommandations du manufacturier (New England Biolabs). Cette analyse a permis de confirmer le contenu des plasmides ainsi que l'orientation des ADNc. Étant respectivement dans les vecteurs pUNI51 et pENTR/SD-dTopo, l'intégrité des ADNc d'*AtAPI* et de *AtFUL* a été confirmée par séquençage au Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill à l'aide d'amorces spécifiques obtenues chez Integrated DNA Technologies Inc. (IDT; Tableau 2.1).

Afin de maintenir et multiplier les ADNc, ceux-ci ont été clonés dans le vecteur pBluescript SK+ (pBSK+). Les ADNc ont d'abord été amplifiés par PCR dans un volume total de 50 µL (1,5 U Taq DNA polymerase, 1X tampon Taq (contenant 1,5 mM MgCl₂), 0,2 mM de mélange dNTP, 2 mM MgSO₄ et 0,5 µM d'amorces) selon les recommandations du manufacturier (UBI). Les amorces spécifiques, commandées chez IDT (Tableau 2.1), contenaient des sites de restriction BamHI et EcoRI permettant de les préparer pour une insertion dans les mêmes sites du vecteur de clonage pBSK+. Ces sites de restrictions ne sont pas présents dans les ADNc des

gènes *AtAPI* et *AtFUL*. Les fragments PCR et le vecteur pBSK+ ont été digérés par BamHI et EcoRI puis séparés par migration sur gel d'agarose 0,8%/TAE 1X (40 mM tampon Tris-acétate pH 8,0 et 1 mM EDTA) pour 80 Vh. Ces fragments ADN ont ensuite été extraits du gel à l'aide de la trousse *QIAquick* selon les recommandations du manufacturier (QIAGEN) puis les inserts ont été ligués aux vecteurs pendant 16 h à 12°C avec la T4 DNA ligase dans un volume total de 10 µL (tampon T4 DNA ligase 1X, 1 U T4 DNA ligase, 125 ng pBSK+, 75 ng *AtAPI* ou *AtFUL* respectivement). Ces plasmides ont alors été insérés dans des bactéries *E. coli* DH10B chimiocompétentes par choc thermique à 42°C pour 1 minute puis additionnés de 1 mL de SOC (2% de Bacto tryptone, 0,5% d'extraits de levures, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose). Les bactéries ont ensuite été incubées à 37°C pendant 1 heure, puis étalées sur milieu LB agar contenant de l'ampicilline (100 µg/mL) et incubées pendant 16 heures. Dix colonies ont été récupérées pour chaque ADNc, puis repiquées dans un milieu LB liquide contenant de l'ampicilline (100 µg/mL). Une mini-préparation de plasmides sur terre diatomée suivie d'une analyse de restriction a alors permis d'identifier les clones contenant *AtAPI* et *AtFUL* respectivement. Ces clones ont ensuite été séquencés au Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill à l'aide d'amorces spécifiques obtenues chez IDT (Tableau 2.1).

TABLEAU 2.1 Oligonucléotides utilisés dans cette étude. Les gènes et leurs numéros d'accension Genbank sont: *AtAPI* (AT1G69120.1), *AtFUL* (AT5G60910.1), *AtMAX4* (AT4G32810.1) et *AtBRC1* (AT3G18550.1).

| Amorces utilisées pour l'amplification des ADNc destinés au clonage et pour la vérification des clones par séquençage. Les sites de restriction utilisés pour le clonage sont soulignés. | |
|--|---------------------------------|
| <i>atAPI</i> -F1 | AAAGGATCCAATGGGAAGGGGTAGGGTTCAA |
| <i>atAPI</i> -F2 | CTGACTCTTGAACCCGTTTAC |
| <i>atAPI</i> -R1 | AAAGAATTCTGCGGCGAAGCAGCCAAGGTT |
| <i>atAPI</i> -R2 | CTATTGATCTTGTCTCTATC |

| | |
|--|--|
| <i>atFUL-F1</i> | AAAGGATCCAATGGGAAGAGGTAGGGTTCAG |
| <i>atFUL-F2</i> | CAAACCTCTCTGCTTCCGGCTT |
| <i>atFUL-R1</i> | AAAGAATTCCTCGTTCGTAGTGGTAGGACG |
| <i>atFUL-R2</i> | CTATTGATCTTGTCTCTATC |
| <i>taVRN1-F1</i> | AAAGGATCCAATGGGGCGCGGGAAGGTGCAG |
| <i>taVRN1-F2</i> | CCCCACCCCGACGGGGCTTC |
| <i>taVRN1-R1</i> | AAAGAATTCGCCGTTGATGTGGCTAACCAT |
| <i>taVRN1-R2</i> | CGGTTGATCTTGTCTCGATC |
| Amorces utilisées pour préparer les sondes pour les analyses de retard sur gel. Les motifs CArG sont en gras, les mutations des motifs sont soulignées dans les séquences mutantes. | |
| AP1CArG1-S1 | ATTTATTTTTCTAAAATTAGTATAATTGTTG |
| AP1CArG1-AS1 | CAACAATTATACTAATTTTAGAAAAATAAAT |
| AP1CArG1mut-S1 | ATTTATTTTTCTAA <u>AC</u> CTAGTATAATTGTTG |
| AP1CArG1mut-AS1 | CAACAATTATACTAG <u>G</u> TTTAGAAAAATAAAT |
| MAX4CArG1-S1 | ATCGTCATTTACGCGTATCTAAAAAATGAATAT |
| MAX4CArG1-AS1 | TAGCAGTAAATGCGCATAGATTTTTTACTTATA |
| MAX4CArG1mut-S1 | ATCGTCATTTACGCGTATCTA <u>ACCA</u> ATGAATAT |
| MAX4CArG1mut-AS1 | TAGCAGTAAATGCGCATAGATT <u>G</u> GTTACTTATA |
| MAX4CArG2-S1 | GTATAGAATACACCCATATATATGTATAT |
| MAX4CArG2-AS1 | CATATCTTATGTGGGTATATATACATATA |
| MAX4CArG2mut-S1 | GTATAGAATACACCCATAC <u>G</u> TATGTATAT |
| MAX4CArG2mut-AS1 | CATATCTTATGTGGGTAT <u>G</u> CATACATATA |
| MAX4CArG3-S1 | CAACCTTTAAATAGATGAATC |
| MAX4CArG3-AS1 | GTTGGAAATTTATCTACTTAG |
| MAX4CArG3mut-S1 | CAACCTTTCCATAGATGAATC |
| MAX4CArG3mut-AS1 | GTTGGAA <u>AGG</u> TATCTACTTAG |
| MAX4CArG4-S1 | ATGTCAGTATTTCTATATATTGACGGTTATC |
| MAX4CArG4-AS1 | TACAGTCATAAAGATATATAACTGCCAATAG |
| MAX4CArG4mut-S1 | ATGTCAGTATTTCTAT <u>CC</u> ATTGACGGTTATC |
| MAX4CArG4mut-AS1 | TACAGTCATAAAGATAG <u>G</u> TAACTGCCAATAG |
| BRC1CArG1-S1 | CACAAGGTCCTAATTATAGAAAAAATCTTGATA |
| BRC1CArG1-AS1 | TATCAAGATTTTTTTCTATAATTAGGACCTTGTG |
| BRC1CArG1mut-S1 | CACAAGGTCCTA <u>ACG</u> ATAGAAAAAATCTTGATA |

| | |
|-----------------------|--|
| BRC1CArG1mut-AS1 | TATCAAGATTTTTTCTAT <u>CGT</u> TAGGACCTTGTG |
| BRC1CArG2-S1 | GTACAAGTGTCAATTCTCAAAATTTTGTCTTAGGG |
| BRC1CArG2-AS1 | CCCTAAGACAAAATTTTGAGAATGACACTTGTAC |
| BRC1CArG2mut-S1 | GTACAAGTGTCAATTCTCAA <u>ACG</u> TTTGTCTTAGGG |
| BRC1CArG2mut-AS1 | CCCTAAGACAAA <u>CGT</u> TTTGAGAATGACACTTGTAC |
| BRC1CArGATcon-S1 | ACTTCAAAAACCCCTAAAAAGGCATGAACAACAA |
| BRC1CArGATcon-AS1 | TTGTTGTTCA'GCC'TTTTAGGGGTTTTTGAAGT |
| BRC1CArGATcon mut-S1 | ACTTCAAAAACCCCTAG <u>CA</u> AGGCATGAACAACAA |
| BRC1CArGATcon mut-AS1 | TTGTTGTTCA'GCC'TT <u>GCT</u> AGGGGTTTTTGAAGT |

De façon à pouvoir exprimer les protéines codées par les ADNc, ceux-ci ont été clonés dans le vecteur d'expression pTrcHisB (Invitrogen). Pour ce faire, les souches contenant pBSK/*AtAPI* et pBSK/*AtFUL* ont été mises en culture sur pétri LB agar/ampicilline (30 µg/mL) et incubées pendant 24 h à 37°C puis une colonie a été mise en culture liquide LB/ampicilline (30 µg/mL) pour 16 h à 37°C. Une mini-préparation a permis de récupérer les plasmides qui ont ensuite été digérés par BamHI/EcoRI afin de récupérer les inserts. Ceux-ci ont été ligués au vecteur d'expression pTrcHis B (digéré en BamHI/EcoRI) par ligation pendant 16 h à 12°C avec la T4 DNA ligase dans un volume total de 10 µL (tampon T4 DNA ligase 1X, 1 U T4 DNA ligase, 250 ng pTrcHis B, 75 ng d'insert). De ce mélange, 1 µl a été ajouté à 40 µL de bactéries *E. coli* TOP10 électrocompétentes par électroperméabilisation à 1,8 kV, puis dilué avec 1 mL de milieu SOC et incubé à 37°C avec agitation pendant une heure. Les bactéries ont ensuite été mises sur pétri LB agar/ampicilline (100 µg/mL) puis incubées à 37°C pendant 16 h. Dix colonies ont été récupérées puis repiquées dans un milieu LB liquide contenant de l'ampicilline (100 µg/mL). Les plasmides ont été analysés et séquencés tel que décrit précédemment.

2.4 Production des protéines recombinantes

Détermination des conditions de production des protéines recombinantes

Afin d'obtenir le meilleur ratio possible de protéines recombinantes solubles dans les bactéries, la production de protéines AtAP1, AtFUL et du contrôle TaVRN1 a été induite par ajout de 0,1 ou de 1 mM d'isopropyl- β -D-galactopyranoside (IPTG) aux différentes cultures d'*E. coli* transformées avec pTrcHis B / AtAP1, AtFUL ou TaVRN1 dans du milieu liquide LB/carbénicilline 50 ug/mL incubé à 30°C ou 37°C pour différents temps d'induction (0 h, 1 h, 2 h, 3 h et 4 h). Suite à l'induction, les bactéries ont été centrifugées, puis resuspendues dans un tampon contenant 50 mM phosphate de potassium pH 7,5, 20 mM NaCl, 20 mM KCl, 4% glycérol et 1 mg/mL lysozyme permettant de fragiliser la paroi. Après 30 minutes d'incubation sur glace, les protéines recombinantes ont été récupérées par sonications successives de 10 secondes suivi de pauses de 5 secondes avec un sonicateur Sonic Dismembrator model 500 (Fisher Scientific). Suite à la sonication, l'échantillon a été centrifugé puis le surnageant (fraction soluble) a été transféré dans un microtube de 1,5 mL et mélangé à du tampon d'échantillon Laemmli 2X en ratio 1 : 1. Le culot (fraction insoluble) a été resuspendu dans du tampon d'échantillon Laemmli 1X. Ces échantillons ont été chauffés à 95°C puis déposés sur gel SDS-PAGE 12% pour une migration à 100 V pour 167 Vh. Les protéines d'intérêt ont ensuite été détectées par immunobuvardage de type western (voir section 2.5). Il a ainsi été déterminé qu'AtAP1, AtFUL se retrouvent principalement dans les corps d'inclusion et que les meilleures conditions d'induction étaient de 2 h avec 1 mM d'IPTG à 37°C.

Purification des protéines recombinantes – méthode dénaturante – Ni-NTA

Une première méthode de purification a été élaborée en condition dénaturante sur colonne CL-6B nickel-acide nitriloacétique (Ni-NTA), selon le protocole de purification d'Invitrogen. Pour ce faire, le lysat bactérien (20 mM phosphate de potassium pH 8,0, 500 mM NaCl, 8 M urée) a été additionné de résine Ni-NTA [1:4] et incubé à 4°C pour une heure avec agitation. Le mélange a été chargé dans la colonne et l'éluat ("Flow through") a été récupéré. La colonne a ensuite été rincée deux fois avec 4 mL de tampon de rinçage (20 mM phosphate de potassium pH 6,0, 500 mM NaCl, 8 M urée) puis les deux fractions de rinçage ont été récupérées. Ensuite, les protéines ont été éluées en quatre fractions de 0,5 mL de tampon d'élution (20 mM phosphate de potassium pH 4,0, 500 mM NaCl, 8 M urée). Toutes ces fractions ont été analysées par SDS-PAGE sur gel 12%. Les protéines d'intérêt ont ensuite été détectées par immunobuvardage de type western (voir section 2.5).

Les protéines purifiées ont ensuite été dialysées dans différents bassins de tampon 50 mM phosphate de potassium pH 7,5, 20 mM NaCl, 20 mM KCl, 4% glycérol aux concentrations décroissantes d'urée (8 M, 4 M, 2 M, 1 M, 0,5 M, 0,25 M et 0 M). Or, cette approche n'a pas permis d'obtenir des protéines ayant une interaction avec les sondes ADN du Tableau 2.1.

Purification des protéines recombinantes – méthode native – Ni-NTA

Une seconde méthode de purification a été élaborée en condition native sur colonne Ni-NTA, selon le protocole de purification d'Invitrogen. Suite à l'induction, les bactéries ont été centrifugées, puis resuspendues dans un tampon contenant 50 mM phosphate de potassium pH 7,5, 20 mM NaCl, 20 mM KCl, 4% glycérol et 1 mg/mL lysozyme. Après 30 minutes d'incubation sur glace, les protéines recombinantes ont

été récupérées par sonication. Suite à la sonication, l'échantillon a été centrifugé puis le surnageant transféré dans un tube conique Sarstedt et a été additionné de résine Ni-NTA [1:4] puis incubé à 4°C pour une heure avec agitation. Le mélange a été chargé sur une colonne de chromatographie Poly-Prep® de Bio-Rad et l'éluat ("Flow through") a été récupéré. La colonne a ensuite été rincée deux fois avec 4 mL de tampon de rinçage (phosphate de potassium pH 7,5, 100 mM NaCl, 50 mM KCl, 20 mM imidazole) puis les deux fractions de rinçage ont été récupérées. Ensuite, les protéines ont été éluées en quatre fractions de 0,5 mL avec du tampon d'élution (phosphate de potassium pH 7,5, 100 mM NaCl, 50 mM KCl, 250 mM imidazole). Toutes ces fractions ont été analysées par SDS-PAGE sur gel 12%. Les protéines d'intérêt ont ensuite été détectées par immunobuvardage de type western. Les protéines recombinantes AtAP1 et AtFUL n'ont pas été retenues dans la colonne Ni-NTA en condition native malgré leur 6-His tag, et le rendement de purification était donc nul.

Purification des protéines recombinantes – méthode native colonne anionique UNO Q1 sur Biologic Duoflow

Une troisième méthode de purification a été élaborée en condition native sur colonne à échange d'ion anionique UNO Q1 avec un système de purification chromatographique BioLogic DuoFlow (Bio-Rad). Suite à l'induction des bactéries et leur sonication, l'échantillon de protéines a été centrifugé puis le surnageant a été chargé sur la colonne UNO Q1 et l'éluat ("Flow through") a été récupéré en fraction de 0,5 mL. La colonne a été rincée avec 8 mL de tampon de rinçage (50 mM phosphate de potassium pH 7,5, 20 mM NaCl) puis les fractions de rinçage ont été récupérées. Ensuite, les protéines ont été éluées à l'aide de concentrations croissantes de NaCl (concentration finale : 50 mM phosphate de potassium pH 7,5, 500 mM NaCl) pour un volume total de 10 mL récolté avec du tampon d'élution en fractions

de 0,5 mL. Toutes ces fractions ont été analysées par SDS-PAGE sur gel 12%. Les protéines d'intérêt ont ensuite été détectées par immunobuvardage de type western. Les protéines recombinantes AtAP1 et TaVRN1 étaient faiblement purifiées par cette méthode, et la protéine AtFUL n'a pas pu être éluée par cette méthode.

Afin d'améliorer les rendements de cette méthode, des altérations aux pH ont été apportées. L'approche décrite précédemment a été répétée mais à pH 8.0. Puis les protéines ont été éluées de la colonne en variant le pH (concentration finale : 50 mM phosphate de potassium pH 6,0, 500 mM NaCl) pour un volume total de 10mL récolté en fractions de 0,5 mL de tampon d'éluion. Toutes ces fractions ont été analysées par SDS-PAGE sur gel 12%. Les protéines d'intérêt ont ensuite été détectées par immunobuvardage de type western. Les protéines recombinantes AtAP1, AtFUL et TaVRN1 sont purifiables par cette méthode. Toutefois, leur rendement était variable.

2.5 Immunobuvardage de type western

Les immunobuvardages de type western ont été effectués par transfert liquide (Bio-Rad TransBlot) sur membrane PVDF 1 heure à 100V dans un tampon 25 mM Tris, 192 mM glycine et 15% de méthanol. Une fois le transfert effectué, les liaisons non-spécifiques ont été bloquées en immergeant les membranes dans du blotto (solution de lait écrémé en poudre dilué à 4% (p/v) préparé dans une solution de lavage 1X PBS [137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄], 0,2% Tween-20) durant une heure. Ensuite la membrane a été incubée avec l'anticorps conjugué Penta His HRP (pour horseradish peroxydase; QIAGEN) dilué 1 :50000 dans du blotto pour une heure. La peroxydase permet la détection de protéines d'intérêt à l'aide d'un substrat devenant chimioluminescent par l'action de cette peroxydase. La membrane a ensuite été rincée trois fois pour 10 minutes dans la solution de lavage

(1X PBS, 0,2% Tween-20) et les protéines reconnues par l'anticorps ont été révélées en utilisant la trousse Western Lightning-ECL (PerkinElmer) comme substrat. La chimioluminescence a été captée dans une chambre noire sur film rayon-X (Kodak). Les membranes ont ensuite été rincées puis colorées 5 minutes avec une solution de coloration Amido Black (0,1% Amido Black (naphtol blue black), 40% méthanol, 10% acide acétique) puis rincées avec une solution de rinçage (méthanol 90%, acide acétique 2%) permettant de détecter le poids moléculaire des protéines ayant été détectées lors de l'immunobuvardage.

2.6 Gels de retardement

Préparation des sondes ADN

Les fragments double-brin ADN ont été préparés à partir d'oligonucléotides sens et antisens complémentaires correspondants aux motifs CArG des régions promotrices de *AtMAX4* (AT4g32810), *AtMAX2* (AT2G42620) et *AtBRC1* (AT3G18550), obtenus chez IDT (Tableau 2.1). Ceux-ci ont été resuspendus dans le tampon 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA à une concentration finale de 100 μ M. Ensuite, ces oligos sens et antisens ont été mélangés ensemble en concentration équimolaire (concentration finale 50 μ M) pour un volume final de 50 μ L, et le mélange a été chauffé à 94°C pour 5 minutes puis laissé à refroidir jusqu'à température pièce. Les oligonucléotides et les fragments double-brin ont été analysés par PAGE non dénaturant sur gel 20% (acryl : bis ; 39 :1) à 70 V pour 123 Vh et colorés au SYBR Safe.

Radiomarquage des sondes ADN

Les fragments double-brin ADN (1,0 μL de 50 μM) ont été radiomarqués avec 0,2 μL de [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]ATP (PerkinElmer) et 0,5 μL de T4 polynucléotide kinase 1 U/ μL dans du tampon PNK 1X (50 mM imidazole-HCl pH 6,6, 10 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, 0,1 mM spermidine et 0,1 mM EDTA) (Promega) pour un volume final de 10 μL , incubé 30 minutes à 37°C. La réaction a été arrêtée par précipitation à -80°C pendant 10 minutes avec 5 μL d'EDTA 0,5 M, 5 μL d'ARNt 10 mg/mL, 5 μL d'acétate de sodium pH 5,2 3 M et 130 μL d'éthanol 100% (Feinberg et Vogelstein, 1984). Ensuite, les sondes radiomarquées ont été centrifugées à 14 000g pour 10 minutes, et le culot, une fois toute trace d'éthanol éliminée, a été resuspendu dans 500 μL H_2O afin de donner une concentration finale de 100 nM de sondes radiomarquées.

Analyses de retard sur gel

Les réactions de liaison aux sondes ADN double-brin radiomarqués des régions portant les motifs CArG des promoteurs de *AtMAX4*, *AtMAX2* et *AtBRC1* ont été effectuées dans un volume final de 40 μL du tampon de liaison 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 4% glycérol, 20 mM KCl, 1 mM dithiothréitol, contenant 0,2% (v/v) Triton X-100, 2,5 nM ($\sim 5 \times 10^4$ cpm) de sondes radiomarquées et des protéines recombinantes provenant de 0, 5, 10 ou 15 μL d'un lysat d'extraits bruts de chacun des clones *E. coli*. Ces lysats ont été obtenus après induction à l'IPTG et sonication des bactéries dans un tampon 50 mM phosphate de potassium pH 7,5, 20 mM NaCl, 20 mM KCl, 4% glycérol et 1 mg/mL lysozyme. Le milieu de liaison tient compte de la variation en sels dû à l'ajout de quantités croissantes de lysat, afin de garder les mêmes concentrations finales. La spécificité de liaison a été vérifiée par compétition avec 125 et 250 nM de sondes non-marquées, et par des tests avec des sondes contenant des olionucléotides mutés (Tableau 2.1). Les milieux de liaison ont été incubés 15

minutes à température pièce puis ont été résolus par électrophorèse sur un gel non-dénaturant de polyacrylamide 4%, préparé dans du Tris-borate-EDTA (TBE) 0,5X, à 80V pour 60 minutes. Les gels ont ensuite été séchés et exposés à des écrans K (Kodak) et le signal a été détecté avec le système Personal Molecular Imager FX (Bio-Rad).

CHAPITRE III

RÉSULTATS

La surexpression du facteur de transcription à boîte MADS du blé TaVRN1 chez *Arabidopsis* induit une ramification anormalement abondante dans les plants transgéniques comparativement aux plants de type sauvage. Chez ces plants modifiés, l'analyse des niveaux d'expression a montré que le niveau de transcrits des gènes *AtAP1* et *AtMAX4* est nettement plus abondant (Adam et al., 2007). Dans la même étude, il a été démontré que TaVRN1 se lie à des motifs CArG des régions promotrices des gènes *AtAP1* et *AtMAX4*.

Chez *Arabidopsis*, les gènes *AtAP1* et *FRUITFUL (AtFUL)*, codant pour des facteurs de transcription à boîte MADS, appartiennent au même clade que *TaVRN1*, soit le clade *API/SQUA* (Danyluk et al., 2003). Il était alors intéressant de vérifier si *AtAP1* et *AtFUL* peuvent se lier aux différents motifs CArG des régions promotrices de gènes associés au branchement. Ceci devait permettre d'identifier l'orthologue de TaVRN1 chez *Arabidopsis*. Parallèlement, la découverte récente d'un autre gène associé au branchement, *AtBRC1*, apporte de nouveaux questionnements sur la ramification des plantes supérieures. La caractérisation de ce gène se devait alors d'être à l'avant-plan.

3.1 Analyse des régions promotrices et 5'UTR

Les gènes *AtBRC1*, *AtMAX2* et *AtMAX4* constituent des gènes clés dans la voie de signalisation de la ramification des plantes. Afin de détecter la présence de motifs CArG, la région constituée des 1700 nucléotides en amont de l'ATG (régions promotrices et 5'UTR) du gène codant pour le facteur de transcription à boîte MADS, *AtAP1*, ainsi que des gènes-clé *AtBRC1*, *AtMAX2* et *AtMAX4* a été analysée à l'aide

du programme Signal Scan (Prestridge, 1991) et de la base de données PLACE (pour PLant Cis Acting regulatory Elements) (Higo et al., 1999). Ces analyses ont ainsi permis l'identification de plusieurs motifs CArG et CArG consensus (Minty et Kedes, 1986; Pollock et Treisman, 1991; Shore et Sharrocks, 1995; de Folter et Angenent, 2006) (Figures 3.1 à 3.4). Il est généralement admis que la très grande majorité des éléments *cis* de régulation transcriptionnelle dans les promoteurs de plantes sont situés dans la région proximale, et généralement à moins de 500-700 bases en amont du site d'initiation de la transcription (Davidson et Erwin, 2006). Par conséquent, seul les motifs CArG de la portion proximale (800 pb) des régions promotrices analysées par Signal Scan ont été retenus puis synthétisés sous forme d'oligonucléotides sens et antisens (Tableau 2.1) afin de constituer des sondes ADN utilisées dans les analyses de retard sur gel. Concernant *AtBRC1*, les motifs CArG1, CArG2 et CArGcons, respectivement situés à 2, 47 et 654 nucléotides en amont de l'ATG, ont été retenus (Figure 3.2). Les motifs situés à 833, 1142 et 1609 nucléotides en amont de l'ATG ont été exclus. Puisque *AtMAX2* ne contenait qu'un motif CArG situé à 1227 nucléotides en amont de l'ATG (Figure 3.3), celui-ci n'a pas été inclus dans cette étude. Pour *AtMAX4*, les motifs CArG1 et CArG2 situés à 214 et 756 nucléotides en amont de l'ATG ont été retenus (Figure 3.4). Les motifs CArG3 et CArG4 d'*AtMAX4* situés à 1467 et 1633 nucléotides en amont de l'ATG (Figure 3.4) ainsi que le motif CArG1 d'*AtAPI* situé à 1485 nucléotides en amont de l'ATG ne sont donc pas dans la région proximale de 800 pb de leur région promotrice respective (Figure 3.4). Toutefois, ils ont tout de même été sélectionnés puisqu'ils ont été employés lors d'une étude précédente (Adam et al., 2007). Ces auteurs ont rapporté que la protéine TaVRN1 du blé se lie aux motifs *AtAPI* CArG1, *AtMAX4* CArG1 et *AtMAX4* CArG4. L'étude montre aussi que TaVRN1 ne se lie pas aux motifs *AtMAX4* CArG2 et *AtMAX4* CArG3. Ces différents motifs ont donc été employés comme contrôles dans l'étude actuelle. De plus, afin de pouvoir vérifier la spécificité des motifs CArG à l'étude, des motifs contenant des mutations ont été élaborés. Ces motifs diffèrent

des CARG natifs par la substitution de deux nucléotides A ou T par deux nucléotides C ou G directement au milieu du motif CARG (Tableau 2.1).

```

-1700 ccatttcaag tatatatgtc ataccatacc agatttaata taacttctat
-1650 gaagaaaata cataaagttg gattaaaatg caagtgacat ctttttagca
-1600 taggttcatt tggcatagaa gaaatatata actaaaaatg aactttaact
-1550 taaatagatt ttactatatt acaatttttt ctttttacat ggtctaattt
-1500 atttttCTAA AATTAGtata attggtgttt tgatgaaaca ataataccgt
-1450 aagcaatagt tgctaaaaga tgtccaaata tttataaatt acaaagtaaa
-1400 tcaaataagg aagaagacac gtggaaaaca ggaaataaga gaagaaatgg
-1350 aaaaaacaga aagaaatfff ttaacaagaa aaatcaatta gtcctcaaac
-1300 ctgagatatt taaagtaatc aactaaaaca ggaacacttg actaacaag
-1250 aaatttgaaa cgtggtccaa ctttcactta attatattgt tttctctaag
-1200 gcttatgcaa tatatgcctt aagcaaatgc cgaatctgtt tttttttttt
-1150 ttgttattgg atattgactg aaaataaggg gttttttcac acttgaagat
-1100 ctcaaaagag aaaactatta caacggaaat tcattgtaaa agaagtgatt
-1050 aagcaaattg agcaaagggt tttatgtggt ttatttcatt atatgattga
-1000 catcaaattg tatatatatg gttgttttat ttaacaatat atatggatat
-950 aacgtacaaa ctaaatatgt ttgattgacg aaaaaaata tatgtatgtt
-900 tgattaacaa catagcacct attcaactga tttttgtcct gatcatctac
-850 aacttaataa gaacacacaa cattgaacaa atctttgaca aaatactatt
-800 tttgggtttg aaatfffgtg tacttacaat tattcttctc gatcttcctc
-750 tctttcctta aatcctgcgt acaaatccgt cgacgcaata cattacacag
-700 ttgtcaattg gttctcagct ctacaaaaa catctattgc caaaagaaag
-650 gtctatttgt acttcactgt tacagctgag aacattaaat ataataagca
-600 aatttgataa aacaaagggt tctcacctta ttccaaaaga atagtgtaaa
-550 atagtgtaat agagaaatgt taataaaaag aaattaaaaa tagatatfff
-500 gggtgggttca gattttgttt cgtagatcta cagggaatc tccgcggtca
-450 atgcaaagcg aaggtgacac ttggggaagg accagtggtc cgtacaatgt
-400 tacttaccca tttctcttca cgagacgtcg ataatcaaat tgtttatttt
-350 catatfffita agtccgcagt tttattaaaa aatcatggac ccgacattag
-300 tacgagatat accaatgaga agtcgacacg caaatcctaa agaaaccact
-250 gtgggtttttg caaacaagag aaaccagctt tagctttttcc ctaaaaccac
-200 tcttacccaa atctctccat aaataaagat cccgagactc aaacacaagt
-150 ctttttataa aggaaagaaa gaaaaacttt cctaattggt tcataccaaa
-100 gtctgagctc ttctttatat ctctcttgta gtttcttatt gggggtcttt
-50 gttttgtttg gttcttttag agtaagaagt ttCTTAAAAA AGgatcaaaa
1 ATG

```

FIGURE 3.1. Région promotrice et 5'UTR du gène *APETALA1* chez *Arabidopsis thaliana* (*AtAP1*; AT1G69120.1). La séquence a été analysée avec le logiciel SignalScan et la base de données PLACE. Les motifs CARG sont en caractères gras et les régions utilisées dans les expériences de retard sur gel sont soulignées.


```

-1700 cagttcgata gattatctaa tataagattt ttttgtcaaa tttttttttt
-1650 gatctagtat aagtttttta tttatgaaac aaCAAAATAAA AGatttggac
-1600 ttaagaatgg atagaagttt tggaaataaca atatttgtgt cctatgtata
-1550 aaaattatta gatagagata caaaaattgt tatctgaaca aatgcaatat
-1500 atcaatagtt agtgtacata tgaagtcata agaattacac caaaatactc
-1450 tttaaaaata tgaaaaagtt gtttatagtg ttttgaaaaa taccaccaa
-1400 caaaacttta taattttatt tgaccttagt tctttcttac ggtgaaatgc
-1350 aatcaatat tttatatata ttttaattat atattccttg ttcctatttc
-1300 ctttagacat aatctaaaat cttctaactt ttcttctatt aatccttttc
-1250 caaataaagg cataactaat aataaaaatt atccttaatt ttatctcata
-1200 tttatttcta ttcaactttt tattttgatc ttcttaatat gcaaacataC
-1150 ATTATATGt ctatttttgg gtgaaattaa atctcattac cttttatttc
-1100 tttcatttag ttataccttg atctttatct actaaaaata ttaaaaaata
-1050 taatcaatgt ggaaaaatct atctaactaa attttaaatg tcatttcaat
-1000 aatttaaata aagatctggt tatttaaagt gaaatgttaa tgtaattggt
-950 aaatatatgt tctgtcaaga aactgtaata ttaattattc tagctaaatc
-900 ctaaagttaa aacatatatt ctatagtaaa tacagtgaat tattttatat
-850 tgaattaaCT ATTTTAGgc atcttttagt gcatgctatt aattttaaag
-800 atatatacaa tctttgatta gttgaaatat agctgtcaac aatttaatat
-750 ctatcaaata attatactga gttcttatct acatattagt aatgaactat
-700 ctcaaagaaa tataagaaca taaacaaaca caaggtcCTA ATTATAGaaa
-650 aaaatcttga taatcaaata aaacgaacat ctattatcac attttcacia
-600 aaaacaaaaa cgaatatatt tttatcatgc cgaagctagg aattaagaaa
-550 aatatataaa caaaataaat gctttttcaa aggcctatat gttgttcctt
-500 cccccataat gatctctttg cctctctctc catatagctc tccctctctc
-450 tctctttttc tctctctttc tctccattct agttcatagc acatagactc
-400 atttaagtac gtcgcctgtg ttgtctttct caaccattag tcccttgctt
-350 cgataaaggt attctctctc tacacattta gacacacaca tagattctct
-300 agaacaaaga catattgtac tatctgacta atcactatta ctgctctttt
-250 tttttcttga ttttgcaggc taaggaaaaa aagaaatctc tctttctaat
-200 tttcttgttt tcattttggt tgagacttga gatcaatgtc ttcgctcattg
-150 gaacagtaac ctttctcttt gattcaaact ttctttcatt ttcttctctt
-100 ttttcttgtg tgtctgaaga agattatagt acaagtggtca ttctCAAAAT
-50 TTTGtcttag ggttttttaa ttttgttact tcaaaaaccC CTAAAAAGGc
1 ATGAACAACA A

```

FIGURE 3.2. Région promotrice et 5'UTR du gène *BRANCHEDI* chez *Arabidopsis thaliana* (*AtBRC1*; AT3G18550.1). La séquence a été analysée avec le logiciel SignalScan et la base de données PLACE. Les motifs CARg sont en caractères gras et les régions utilisées dans les expériences de retard sur gel sont soulignées.

```

-1700 ttctcactat tgctttcgtg attatgctca ctgagttatc cattaagctt
-1650 tttaaaagtt aaacactatt ttgaaaatat aaattgtatt tacggtggag
-1600 aaataatcaa aacctatat ttattttaatt tgtaacatga ctgagcgccg
-1550 cttattaagc gggaaacgta tctaattaaa tactctttga actgaatcga
-1500 ttcactgtat tggatctata tttctcttaa aatggaaatg aagttcagct
-1450 tatcttttag ttgttgcacg cattcttacg tgattccaat tatgaatttg
-1400 gaaaagactc gatattctta catatatgtt atgggtttgg gatttatcta
-1350 gatcctgac ttatagtaaa attatctgca gtttaaatac atttctgtac
-1300 atgacacaaa tcagtgtttt tgatgctgtt ttattccgac ttcactctct
-1250 gttgcagtca gtaaCTTAAT ATTGgggggtt ttcttaatat ttttaaggtta
-1200 ttgaattcta aatcttgcaa aatagttgtg tttagtttta gttattttcc
-1150 tattaaagct catgtctatc aacaaagaag gttggtatta ttcttgaggg
-1100 acataaacia atgttagatg catgcacggg aaaaagggtg attgttcttt
-1050 acaggaaaaa tatgcaattc aagtgggaac ataagggaga gagagggata
-1000 ggttgatttt gactcttgca atttgattat ataatatcaa atatgtatat
-950 ttgtttaatg attaagaaca attgtcaagt tacggcgatt ccataataat
-900 acgaatgatc tcacaaacaa aatttgctgt gcctctacca aatgaagtat
-850 tgggtcaact gtgacaatgg cgaatgattc aatctattat ctcatacaat
-800 ttttttaag ataaggattt ttttgtaaaa catttgaaag gagcttaagt
-750 aactatgaca catactgcat gtacagtaaa gcatacatgt acccgtaatt
-700 accaaattcg aagatcaaag tttcgaaatc ttttgagtcg gttaatgtgt
-650 aaatctctct ttatcatacc aaagtacatg catagattac aactaaaagc
-600 tgatgagaac acacgaacga aatgaaatag tcaggacatt acatgcaagc
-550 atgcaacttc gtatatccta aacctttcat tttgattagt gatataatga
-500 tatttacatt catagagaaa aaagggtatg caactatgat tttggtttct
-450 ccaaaatagt atatcatcgt ataagtagc ataacaatct ttttgaccaa
-400 tgacaacaca atcccattat ctattgggta tgagtatttt gataaagtaa
-350 ggatttataa agtacaattt gaggatgaat atttttagg ctttaattaaa
-300 gaatgtatgt tctatttttt tttttttttt ttttgacatc gtatgttctt
-250 atataattaa cctcaaagat aatttagatt taatcattta aatacatatg
-200 atttttcaat caaattacct caaaaaagga aagaattata gtactatcta
-150 tattaataag aaaaaaaca taaaagaaga gagaagaaga atgtcagtat
-100 catcacgtgg ctctctctct gcccaacaca aatctcttct tcttccttct
-50 tccctcttct tcttctctaa atctctctct ttgtagattt gccgcttctc
1 ATG

```

FIGURE 3.3. Région promotrice et 5'UTR du gène *MORE AXILLARY BRANCHING 2* chez *Arabidopsis thaliana* (*AtMAX2*; AT2G42620.1). La séquence a été analysée avec le logiciel SignalScan et la base de données PLACE. Le motif CARG est en caractères gras.

```

-1700 agttgtaaat aaattctcta aaaaaactaa ttgagaaaat aaatatatgt
-1650 cagtatttCT ATATATTGac ggttatcaaa atgtaagaca ttttactgtc
-1600 atacaaatag acagacatat atgcatgaca tgtttcatac aaacattcta
-1550 tgattgtatt tatgttttta tatgtaaacg ttacgtgtag aacaacgttt
-1500 aagataatgg tcatatcaat caacCTTTAA ATAGatgaat caaagggtgct
-1450 tcctttgttt gaacttctaa atccacacaa aaatacaaga aaagtcaaat
-1400 aatgtggtct ttatcatatt tgtttgctcc gaaaatatag tgtcacttga
-1350 acaaaactct tgacaaactg gcctatactg gttttttttc ttaaccaatt
-1300 tatccgttaa ttttcaatgc cgtattgggt tcaactcgaa gcatttcctg
-1250 tcagtcatta taatccacca ataatgtcag tttctctctc tcgccccaaa
-1200 acgaacgac gaggtgaata taaatgaaac atgtacatta attaatatat
-1150 ttatatcaaa gttttttccg gctttgaagc ttgaaaatac tccatatatt
-1100 atatacttct ttgtgctaatt ttgtcgacgc tttggccatt ttcattctatc
-1050 atcgaggatt cacaattttt ggtgcgtatc gtttacatga tcgaagaaat
-1000 agatatctgt aggatattat gacaatgtaa attaaatata gtttttcttt
-950 agtctgttga ttatctttat gcttagttta agaaatagtg taaacgctta
-900 atatactcac tttgcatgac ccatataaac agtgtaaacy ctaaaatata
-850 actcttcac acccatattg atttacccta aaatcacatt caccattgcg
-800 tctgatggaa gtaatattta agtatagaat acaccCATAT ATATGtatat
-750 ttattcataa tattatatca atatatattc atatatacgc gttgacaaaa
-700 cagaaattca ttctaacacg tacgtttatt taactttgat aatgctagag
-650 tattattgac aggtataccg tgtacatgga attaatgttt ttactcgctg
-600 ctaataaaaat gtatcttacc accaatttaa gcgaacgat atcgtattat
-550 ttttaacaata gtttcagcag ctgcagggtt ccaacgacta atcttttaaa
-500 ttttggaata gcgatcatat tcatcatata tcgttaataa tcatgaacca
-450 aatatgattt ggtcgccaaa atctataata tcatcgttag aacttgctgc
-400 tattttttaa cctatcatta acttaacata agacaaacaa gacttggttc
-350 ttggttacaa ccactagtga ttgtaaaacg aattatctta actatgaaag
-300 aggtatccta caaattaaaa ccgcatcaaa acttaccgtc aaacttcttt
-250 taaataatta tcgtcattta cgcgtatCTA AAAAATGaat atatttatc
-200 aacttgaata agaatccatc atttgtaaca agatccctta agcgagaccc
-150 tataaataca tcacatgcgt agcaccaaac attcactaaa acttcattta
-100 ctttcttgaa cttgtcttgt gccctctttc caatacactg aaatccactt
-50 caaaatattt atttaataaa aagaaaagaa aagaaaaaaa ctctgccagg
1 ATG

```

FIGURE 3.4. Région promotrice et 5'UTR du gène *MORE AXILLARY BRANCHING 4* chez *Arabidopsis thaliana* (*AtMAX4*; AT4G32810.1). La séquence a été analysée avec le logiciel SignalScan et la base de données PLACE. Les motifs CARG sont en caractères gras et les régions utilisées dans les expériences de retard sur gel sont soulignées.

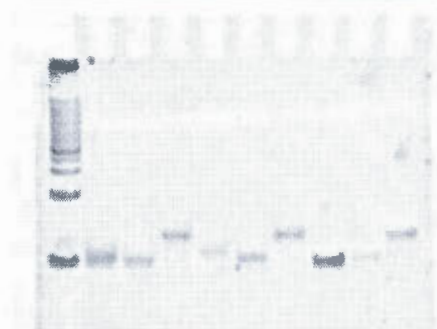
La Figure 3.5 présente les différents fragments double-brin utilisés dans notre étude. Pour chaque motif sélectionné, des oligonucléotides sens et antisens de vingt à trente nucléotides contenant les motifs CARG natifs ont été synthétisés (Tableau 2.1). Ces oligonucléotides, qui sont des simples brins d'ADN, ont alors été appariés en fragments ADN doubles brin par une technique usuelle d'hybridation d'ADN par la

chaleur. Ainsi, les fragments sens et antisens sont chauffés puis refroidis lentement, ce qui favorise l'appariement en fragments double-brin, plus stables que le brin simple. Afin de vérifier que l'appariement des oligonucléotides en fragments double-brin a bien été réalisé, 10 μ mol de chacun des oligonucléotides individuels ainsi que du fragment double-brin correspondant ont été séparés sur gel natif PAGE 20% puis révélés au SYBR Safe (Figure 3.6). Puisqu'un fragment double brin migre plus lentement sur gel que l'ADN simple brin qui le compose, il est possible d'observer l'appariement. On remarque que les ADN simple brin migrent à une distance correspondant au nombre de nucléotides prévus, soit à la hauteur du marqueur de poids moléculaire 20 bp Ladder (Invitrogen), et que la migration des fragments double-brin est plus lente. La Figure 3.6A présente la migration du brin sens, du brin antisens et du fragment double-brin pour chacun des motifs CArG des gènes *AtAPI*, *AtMAX4* et *AtBRC1*. Ceci a permis de voir que toutes les sondes ont été appariées. Cette étape de vérification était très importante puisque les fragments double-brins ont été utilisés par la suite dans les analyses de retard de migration électrophorétique avec les différentes protéines recombinantes.

| | |
|-----------------------|--|
| AP1-CArG1 (-1485) | ATTTATTTTT CTAAAATTAG TATAATTGTTG CAACAATTATA CTAATTTTAG AAAAATAAAT |
| AP1-CArG1 mut | ATTTATTTTT CTAAACCTAG TATAATTGTTG CAACAATTATA CTAGGTTTAG AAAAATAAAT |
| BRC1-CArG1 (-2) | CACAAGGTC CTAATTATAG AAAAAATCTTGATA TATCAAGATTTTT CTATAATTAG GACCTTG TG |
| BRC1-CArG1 mut | CACAAGGTC CTAACGATAG AAAAAATCTTGATA TATCAAGATTTTT CTATCGTTAG GACCTTG TG |
| BRC1-CArG2 (-47) | GTACAAGTGTCA TTCTCAAAATTTT GTCTTAGGG CCCTAAGAC CAAAATTTT GAGAATGACACTTG TAC |
| BRC1-CArG2 mut | GTACAAGTGTCA TTCTCAAACGTTT GTCTTAGGG CCCTAAGAC CAAACGTTT GAGAATGACACTTG TAC |
| BRC1-CArG cons (-654) | ACTTCAAAAAC CCCTAAAAGGC ATGAACAACAA TTGTTGTTCA TCGCTTTT TAGGGTTTTTGAAGT |
| BRC1-CArG cons mut | ACTTCAAAAAC CCCTAGCAAGGC ATGAACAACAA TTGTTGTTCA TCGCTTGT TAGGGTTTTTGAAGT |
| MAX4-CArG1 (-214) | ATCGTCATTTACGCGTAT CTAAAAATGA ATAT TAGCAGTAAATGCGCATAG ATTTTTT TACTTATA |
| MAX4-CArG1 mut | ATCGTCATTTACGCGTAT CTAACCAATGA ATAT TAGCAGTAAATGCGCATAG ATTGGTT TACTTATA |
| MAX4-CArG2 (-756) | GTATAGAATACAC CCCATATATAT GTATAT CATATCTTATGTGG GTATATAT ACATATA |
| MAX4-CArG2 mut | GTATAGAATACAC CCCATACGTAT GTATAT CATATCTTATGTGG GTATGCAT ACATATA |
| MAX4-CArG3 (-1467) | CAACCTTT TAAATAG ATGAATC GTTGGAA ATTTATCT ACTTAG |
| MAX4-CArG3 mut | CAACCTTT CCATAG ATGAATC GTTGGAA AGGTATCT ACTTAG |
| MAX4-CArG4 (-1633) | ATGTCAGTATTT CTATATATTG ACGGTTATC TACAGTCATAA GATATATA ACTGCCAATAG |
| MAX4-CArG4 mut | ATGTCAGTATTT CTATCCATTG ACGGTTATC TACAGTCATAA GATAGGTA ACTGCCAATAG |

FIGURE 3.5. Fragments double-brins utilisés comme sondes dans les expériences de retard sur gel. Les séquences correspondent aux oligonucléotides sens et antisens des motifs CArG (version native et version mutée) présents dans les régions promotrices et 5'UTR des gènes *AtAPI*, *AtBRC1* et *AtMAX4*. Le motif CArG est indiqué en gras et les substitutions apportées pour obtenir les motifs mutés sont soulignées. La position du motif CArG dans la région promotrice des différents gènes par rapport à l'ATG est indiquée après le nom de la sonde.

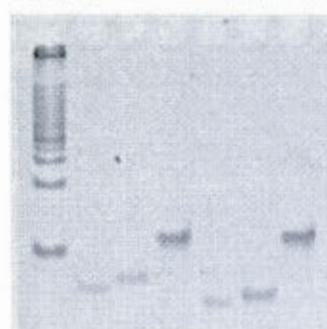
A M 1 2 3 4 5 6 7 8 9



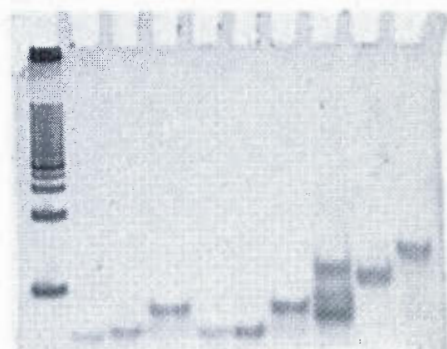
B M 1 2 3



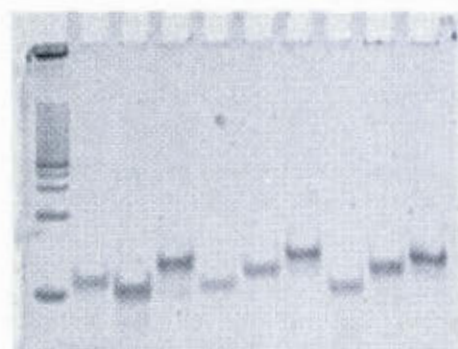
C M 1 2 3 4 5 6



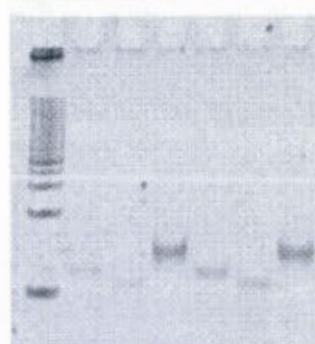
D M 1 2 3 4 5 6 7 8 9



E M 1 2 3 4 5 6 7 8 9



F M 1 2 3 4 5 6



G M 1 2 3 4 5 6

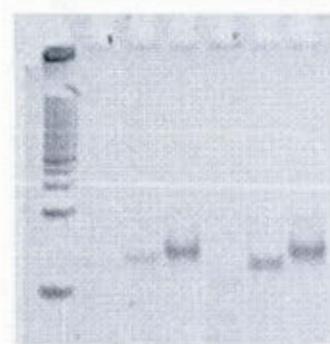


FIGURE 3.6. Vérification des fragments double-brins utilisés pour les expériences de retard sur gel. Les appariements des oligonucléotides sens et antisens des motifs CArG normaux et mutés des gènes *AtAPI1*, *AtBRC1* et *AtMAX4* forment les sondes ADN utilisées dans les expériences de retard sur gel. Un mélange équimolaire des oligonucléotides sens et antisens a été chauffé à 95°C puis refroidi graduellement jusqu'à température pièce. Les appariements ont ensuite été vérifiés du gel natif PAGE 20%. La piste M correspond aux marqueurs de poids moléculaire 20 bp Ladder (Invitrogen).

- A. Pistes 1 à 3 : oligo-S1, oligo-AS1, fragment double-brin AP1CArG1
 Pistes 4 à 6 : oligo-mutS1, oligo-mutAS1, fragment double-brin AP1CArG1mut
 Pistes 7 à 9 : oligo-S1, oligo-AS1, fragment double-brin MAX4CArG1
- B. Pistes 1 à 3 : oligo-mutS1, oligo-mutAS1, fragment double-brin MAX4CArG1mut
- C. Pistes 1 à 3 : oligo-S1, oligo-AS1, fragment double-brin MAX4CArG2
 Pistes 4 à 6 : oligo-mutS1, oligo-mutAS1, fragment double-brin MAX4CArG2mut
- D. Pistes 1 à 3 : oligo-S1, oligo-AS1, fragment double-brin MAX4CArG3
 Pistes 4 à 6 : oligo-mutS1, oligo-mutAS1, fragment double-brin MAX4CArG3mut
 Pistes 7 à 9 : oligo-S1, oligo-AS1, fragment double-brin MAX4CArG4
- E. Pistes 1 à 3 : oligo-mutS1, oligo-mutAS1, fragment double-brin MAX4CArG4mut
 Pistes 4 à 6 : oligo-S1, oligo-AS1, fragment double-brin BRC1CArG1
 Pistes 7 à 9 : oligo-mutS1, oligo-mutAS1, fragment double-brin BRC1CArG1mut
- F. Pistes 1 à 3 : oligo-S1, oligo-AS1, fragment double-brin BRC1CArG2
 Pistes 4 à 6 : oligo-mutS1, oligo-mutAS1, fragment double-brin BRC1CArG2mut
- G. Pistes 1 à 3 : oligo-S1, oligo-AS1, fragment double-brin BRC1CArGATcon
 Pistes 4 à 6 : oligo-mutS1, oligo-mutAS1, fragment double-brin BRC1CArGATcon mut

3.2 Expression des protéines recombinantes AtAP1 et AtFUL

Des souches bactériennes contenant les plasmides portant les ADNc codant pour AtAP1 (stock no. U20604) et AtFUL (stock U16143) ont été obtenus du ABRC. Les plasmides et la souche utilisés pour ces stocks ne nous étaient pas familiers. Pour faciliter nos manipulations, nous avons premièrement transféré ces ADNc dans des systèmes que nous utilisons dans notre laboratoire. Après amplification par PCR, les ADNc ont été clonés dans le vecteur pBluescript, puis introduits dans la souche *E. coli* DH10B. Par la suite, les ADNc ont été clonés dans le vecteur pTrcHis B pour expression dans des bactéries *E. coli* TOP10. Les clones ont été validés par séquençage au Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill.

Pour déterminer les conditions optimales de production de ces protéines recombinantes, différents tests d'expression ont été effectués en faisant varier les

paramètres usuels (température et durée d'induction, concentration de l'inducteur). Dans un premier temps, les clones pTrcHis contenant *AtAPI* et *AtFUL* ont été induits à 37°C avec 1 mM d'IPTG pour 1, 2 et 3 heures, puis les extraits totaux ont été migrés sur gel SDS-PAGE (Figure 3.7). L'immunobuvardage de type western avec l'anticorps penta-his conjugué HRP a montré la production d'une protéine de poids moléculaire d'environ 36 kDa pour le clone contenant *AtAPI* et d'une protéine d'environ 33 kDa pour le clone contenant *AtFUL*. Une seconde bande à 32 kDa est visible pour les pistes d'*AtAPI* et semble correspondre à de la dégradation. Les poids de 36 kDa et 33 kDa sont similaires aux poids théoriques des protéines *AtAPI* et *AtFUL* lorsqu'un peptide de fusion N-terminal contenant la queue 6-histidine du vecteur pTrcHis B est ajouté. De plus, les résultats montrent que la production de ces deux protéines se stabilise après 2 heures d'induction. Dans une seconde expérience, nous avons voulu déterminer si les protéines recombinantes *AtAPI* et *AtFUL* induite dans les bactéries étaient solubles ou insolubles (Figure 3.7). Les résultats montrent que la majeure partie des protéines recombinantes induites se situait dans la fraction insoluble. L'analyse montre malgré tout que la quantité de protéines recombinantes solubles croît pour des durées d'induction plus longues.

Afin d'augmenter la solubilité des protéines recombinantes, nous avons testé l'effet d'une diminution de la température d'incubation des bactéries et de la concentration d'IPTG. Ainsi, nous avons procédé à différentes inductions avec des températures de 30°C et de 37°C et des concentrations de 0,1 mM et 1 mM. Ces inductions ont été exécutées pour des temps de 0, 2 et 4 heures. Les portions solubles et insolubles ont ensuite été analysées par migration sur SDS-PAGE et immunobuvardage de type western (Figure 3.8). Ces analyses ont été exécutées conjointement avec l'induction de la protéine TaADF par pTrcHis (à droite sur les figures), servant de contrôle

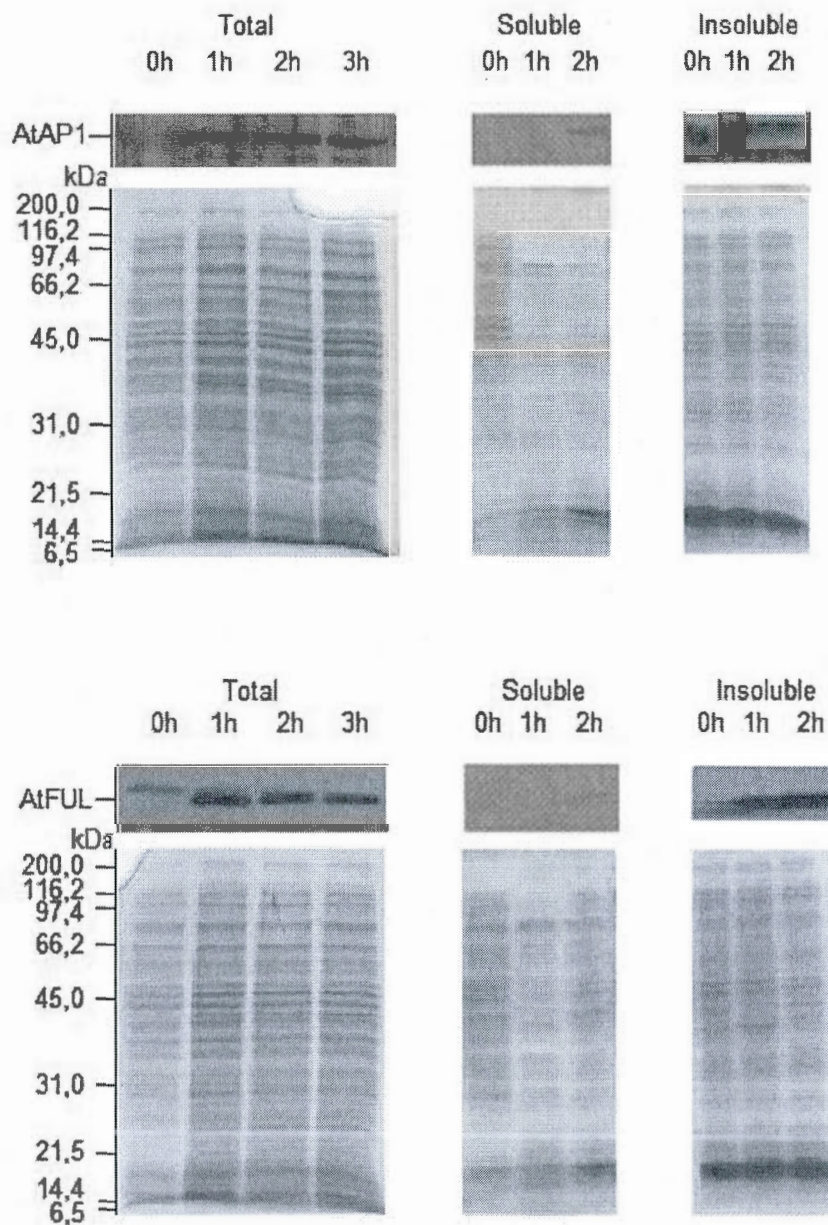


FIGURE 3.7. Expression des protéines recombinantes AtAP1 (A) et AtFUL (B) dans *E. coli*. Les ADNc codant pour les protéines ont été clonés dans le vecteur d'expression pTrcHis, puis ces plasmides ont été transformés dans des bactéries *E. coli* TOP10. Les bactéries ont été mises en culture à 37°C dans un milieu liquide de LB/carbénicilline (50 µg/mL) jusqu'à DO_{600} 0,8, puis l'expression a été induite avec 1 mM d'IPTG pour différents temps. Des extraits de protéines totales des fractions soluble et insoluble ont été analysés par immunobuvardage de type western (panneaux du haut) avec un anticorps primaire anti-His conjugué à une peroxydase. Les panneaux du bas représentent les gels SDS-PAGE colorés au Bleu de Coomassie.

d'induction, et du vecteur vide pTrcHisB (à gauche sur les figures), qui a servi de contrôle "vecteur vide" (queue His seulement). De la dégradation a été observée dans les portions insolubles d'AtAP1 (Figure 3.8 B, D, F, H) et AtFUL (Figure 3.8 H). Concernant la concentration d'IPTG, on remarque que le niveau de production de protéines recombinantes était généralement plus important lorsque les bactéries sont induites avec 1 mM d'IPTG comparativement à 0,1 mM d'IPTG, peu importe la température d'induction (Figure 3.8, comparer pistes C et D avec pistes A et B; et comparer pistes G et H avec pistes E et F). Concernant la température, on remarque qu'AtAP1 et AtFUL sont induits en plus grande quantité lorsque la température est de 37°C (Figure 3.8 E à H) qu'à 30°C (Figure 3.8 A à D). Les meilleurs rendements des protéines recombinantes solubles AtAP1 et AtFUL, qui étaient tout de même faibles, ont été obtenus à 37°C pour 1 mM d'IPTG. Pour augmenter la quantité de protéines produites, les inductions de protéines ont été effectuées par la suite lorsque la DO_{600} de départ était de 1,2 comparativement à 0,8 utilisé précédemment.

3.3 Purification des protéines AtAP1, AtFUL et TaVRN1

Même si la majeure portion des protéines induites a été retrouvée dans les corps d'inclusion, une portion non négligeable est demeurée soluble. De ce fait, une première méthode de purification native a été tentée sur colonne NiNTA. L'analyse des fractions a montré que les protéines AtAP1, AtFUL et TaVRN1 éluaient principalement dans la fraction de chargement (Figure 3.9A, piste FL). Deux volumes de tampon de lavage sans imidazole étaient suffisants pour éluer la totalité des protéines n'ayant pas directement élué de la colonne (Figure 3.9A, pistes w1 et w2). Ainsi AtAP1, AtFUL et TaVRN1 n'ont pas été retenues par la colonne. Il n'y avait donc pas de purification possible par cette approche. Toutefois, les quantités de protéines obtenues pour chacune des protéines ont été sensiblement supérieures

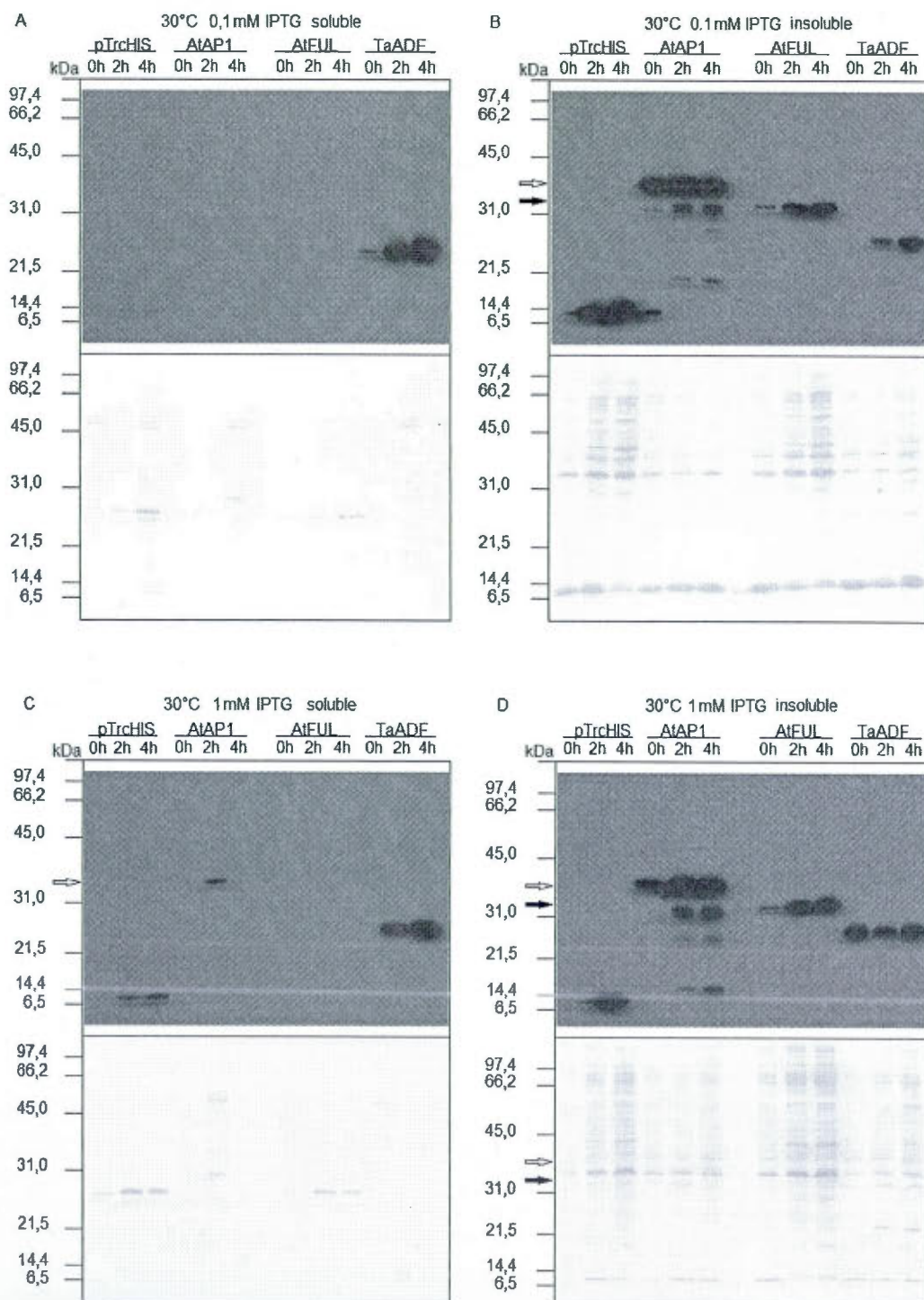
comparativement à auparavant en raison de l'augmentation de DO_{600} avant de débiter l'induction.

Puisque l'approche native sur colonne NiNTA n'a pas fonctionné, nous avons procédé à la purification d'AtAP1, AtFUL et TaVRN1 sur colonne NiNTA de manière dénaturante. La quantité faible dans les fractions de chargement (Figure 3.9B, piste FL) et élevée dans les fractions d'élution (Figure 3.9B, pistes E1 et E2) ont indiqué que les protéines étaient purifiables par cette approche. Toutefois, comme cette purification a dénaturé les protéines, une étape de renaturation était nécessaire. Ainsi, une étape de dialyse menant progressivement à l'élimination de l'urée, l'agent dénaturant, permet normalement la renaturation des protéines. Pour des protéines de nature enzymatique, il est aisé de déterminer si les protéines ont été renaturées lors de ces étapes de dialyse. Cependant, puisque les protéines d'intérêt et le contrôle positif TaVRN1 sont des facteurs de transcription dénués d'activité enzymatique, il est difficile de s'en assurer. Les analyses de retard sur gel effectuées avec ces protéines sur les motifs CArG n'ont donné aucun résultat autant pour le contrôle positif TaVRN1 que pour AtAP1 et AtFUL (données non-présentées).

Puisque les protéines purifiées par ces dernières méthodes n'avaient pas la capacité de se lier aux motifs CArG, une purification de protéines native sur colonne ionique forte a été exécutée où l'élution est par variation de la concentration de NaCl. Cette approche a permis la purification d'une certaine quantité de TaVRN1, mais n'a pas permis de purifier AtAP1 et AtFUL (données non présentées). Cependant les analyses de retard sur gel effectuées avec TaVRN1 purifiée n'a pas permis d'obtenir de retard de migration (données non-présentées), autant avant dialyse qu'après avoir effectué une dialyse afin de diminuer la quantité abondante de NaCl dans les fractions contenant TaVRN1. Suite à la dialyse, l'échantillon protéique s'est avéré peu stable, se dégradant rapidement, malgré l'ajout d'inhibiteur de protéases et de glycérol.

La précédente purification n'ayant pas fonctionné pour AtAPI et AtFUL, une dernière méthode de purification sur colonne ionique forte où l'élution est en fonction de la variation de sel et de pH a permis de purifier une certaine quantité d'AtAPI (données non présentées). Cependant, malgré des efforts d'optimisation de cette dernière méthode, il n'a pas été possible d'obtenir un rendement suffisant pour exécuter les analyses de retard sur gel, ni de diminuer la dégradation survenant après la purification lorsque les protéines ont été conservées à 4°C pour une durée supérieure à un jour. Il n'a donc pas été possible d'optimiser les analyses de retard sur gel par la suite.

Suite à ces nombreuses tentatives, étant donné les contraintes de temps et puisque dans l'étude précédente d'Adam et al. (2007), les analyses de retard sur gel pour TaVRN1 (notre contrôle positif) avaient été effectuées avec des extraits protéiques bactériens non purifiés, nous avons opté d'exécuter les analyses de retard sur gel à partir d'extraits bruts.



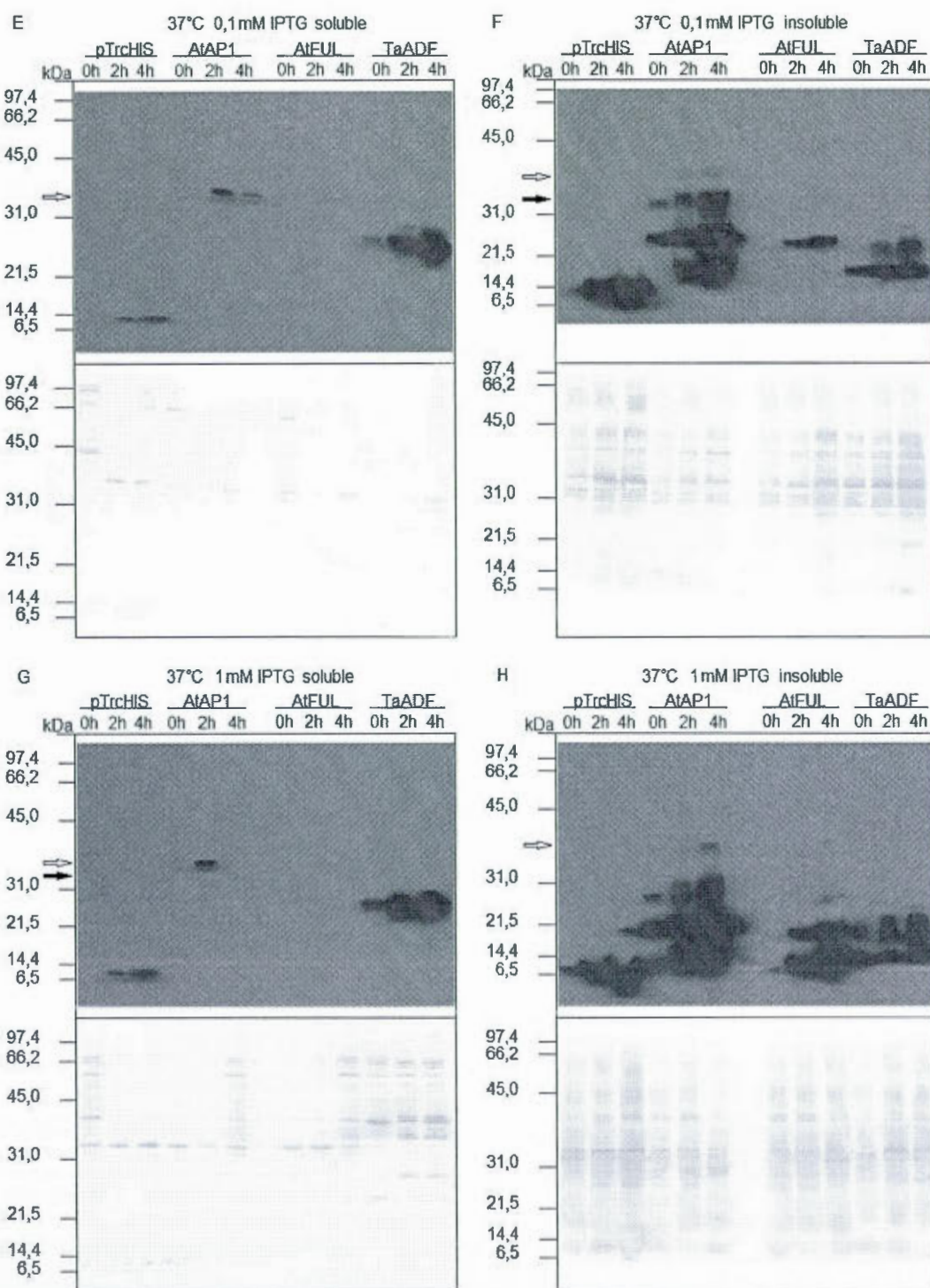


FIGURE 3.8. Optimisation de l'expression des protéines recombinantes AtAP1 et AtFUL. Les souches portant les vecteurs d'expression (voir Figure 3.7) ont été mises en culture à 30°C (A, B, C, D) ou à 37°C (E, F, G, H) dans un milieu liquide de LB/carbénicilline (50 µg/mL) jusqu'à DO_{600} 0,8, puis l'expression a été induite avec 0,1 mM (A, B, E, F) ou 1 mM (C, D, G, H) d'IPTG pour différents temps. Les extraits des fractions soluble et insoluble de chacune des conditions ont été analysés par immunobuvardage de type western (panneaux du haut) avec un anticorps primaire anti-His conjugué à une peroxydase. L'expression à partir du vecteur vide pTrcHis, qui exprime seulement le peptide de fusion His, et du vecteur pTrcHis:TaADF, utilisé comme contrôle d'expression, est aussi présentée. Les panneaux du bas représentent les membranes PVDF colorés à l'Amido Black. Les flèches blanche et noire indiquent les protéines AtAP1 et AtFUL, respectivement.

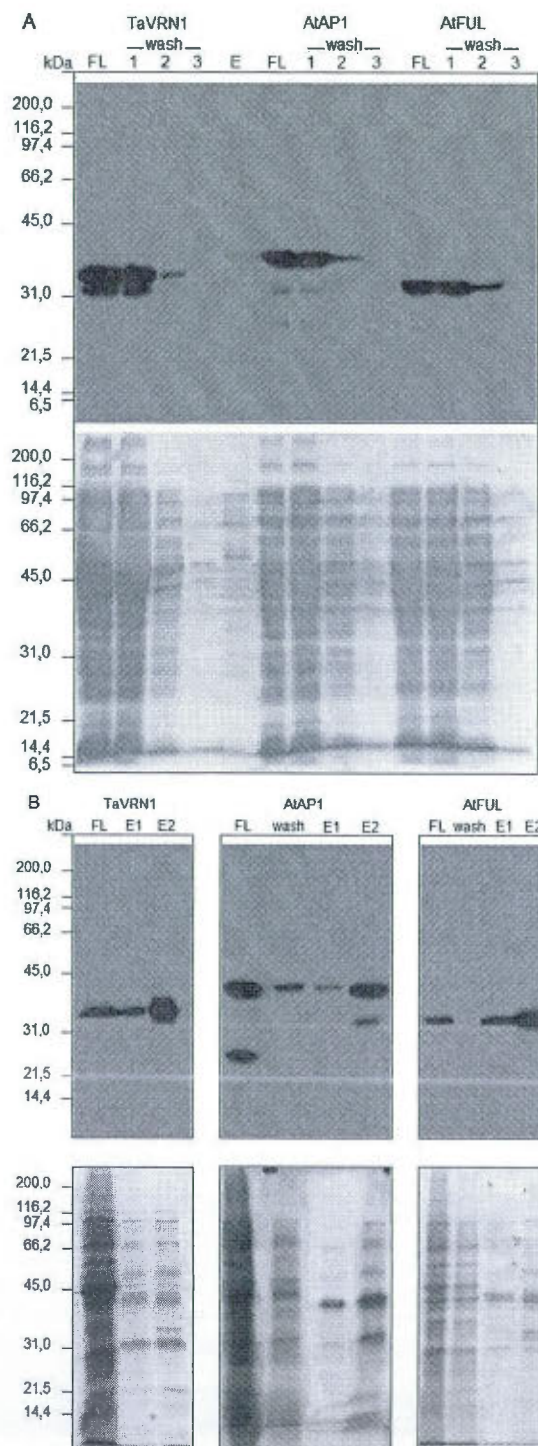


FIGURE 3.9. Purification des protéines recombinantes AtAP1, AtFUL et TaVRN1 par chromatographie sur colonne NiNTA en conditions natives (A) et dénaturantes (B). Les souches portant les vecteurs d'expression (voir Figure 3.7) ont été mises en culture à 37°C dans un milieu liquide de LB/carbénicilline (60 µg/mL) jusqu'à DO₆₀₀ 1,2, puis l'expression a été induite avec 1 mM d'IPTG pour 2 heures. Pour la méthode native (A), les bactéries ont ensuite été centrifugées puis resuspendues dans un tampon 50 mM phosphate de potassium pH 7,5, 20 mM NaCl, 20 mM KCl, 4% glycérol et 1 mg/mL lysozyme. Après 30 minutes d'incubation sur glace, les protéines recombinantes ont été récupérées par sonication et le lysat a été centrifugé. Le surnageant a été additionné de résine Ni-NTA [1:4] puis incubé 1 heure à 4°C avec agitation. La purification a été effectuée selon les conditions natives de colonne NiNTA (Invitrogen). Les fractions "flowthrough" (FL), de trois volumes de lavage ("wash", 1, 2, 3) et d'élution avec 20 mM imidazole (E) ont été récoltées. Pour la méthode dénaturante (B), les bactéries après induction ont été centrifugées puis resuspendues dans un tampon 20 mM phosphate de potassium pH 8,0, 500 mM NaCl, 8 M urée. Après 30 minutes d'incubation sur glace, les protéines recombinantes ont été récupérées par sonication et le lysat a été centrifugé. Le surnageant a été additionné de résine Ni-NTA [1:4] puis incubé 1 heure à 4°C avec agitation. La purification a été effectuée selon les conditions dénaturantes de colonne NiNTA (Invitrogen). Les fractions "flowthrough" (FL) (pH 7,8), de lavage à pH 6,0 ("wash") et d'élution à pH 5,3 (E1) ou 5,4 (E2) ont été récoltées. Les fractions ont été analysées par immunobuvardage de type western (A et B, panneaux du haut) avec un anticorps anti-His conjugué à une peroxydase. Les panneaux du bas (A et B) représentent les gels SDS-PAGE colorés au Bleu de Coomassie.

3.4 Analyses de retard sur gel

Les analyses de retards sur gel montrent que TaVRN1 (Figure 3.10) et AtAP1 (Figure 3.11) interagissent avec plusieurs sondes renfermant les motifs CArG. Ces interactions s'observent en comparant la migration des sondes seules (pistes 1 et 2) aux retards de migration dans les pistes où ont été séparés les mélanges protéine-sonde (pistes 3 à 9). Les pistes 3 à 5 correspondent à trois quantités croissantes de protéines en fonction d'une même quantité de sonde, les pistes 6 et 7 correspondent aux conditions de la piste 5 mais en présence de motifs non-radiomarqués (froids; utilisés comme compétiteurs en excès par rapport à la sonde native; 50X pour la piste 6 et 100X pour la piste 7). Ceci permet de vérifier la spécificité des interactions par une autre méthode que les motifs mutés. Par ailleurs, des interactions ont été observées autant avec les motifs natifs que mutés (pistes 8 et 9). Les pistes 8 et 9 proviennent de réactions de liaison avec une sonde mutée radiomarquée, en absence ou en présence d'un excès de 100X de motifs natifs non-radiomarqués (froids).

Avec TaVRN1, on remarque une légère diminution du signal de la bande retardée dans la piste 7 comparativement aux pistes 4 et 5 pour les motifs CArG1, CArG3 et CArG4 de *AtMAX4* (Figure 3.10A, C et D). Il est aussi possible de remarquer une très faible diminution pour les motifs CArG2 de *AtMAX4* et *AtBRC1* (Figure 3.10B et G). On observe aussi une diminution du signal de retardement dans la piste 9 comparativement à la piste 8 pour les motifs mutants *AtMAX4* CArG1, (Figure 3.10A) ainsi que pour les motifs mutants *AtAPI* CArG1 et *AtBRC1* CArG 1 (Figure 3.10E et F). Qui plus est, l'intensité de liaison des motifs mutants de *AtMAX4* CArG3 et *AtBRC1* CArGATconsensus semble plus forte que les interactions avec les motifs natifs.

Avec AtAP1, on remarque une nette diminution du signal de la bande retardée dans la piste 7 comparativement aux pistes 4 et 5 de tous les motifs de *AtMAX4* (Figure 3.11A, B, C) ainsi que pour les motifs CArG1 et CArG2 de *AtBRC1* (Figure 3.11F et G). Une diminution du signal de la bande retardée s'observe aussi dans la piste 9 comparativement à la piste 8 pour tous les motifs mutants hormis *AtBRC1* CArG consensus (Figure 3.11A à G). De plus, le signal de retardement des motifs mutants de *AtMAX4* CArG1, CArG3 et *AtBRC1* CArGATconsensus semble plus fort que les interactions avec les motifs natifs.

Enfin, les analyses de retards sur gel ont été effectuées autant avec AtAP1, AtFUL (données non présentées) que TaVRN1. Cependant, faute de temps, seulement AtAP1 et TaVRN1 ont pu être optimisés de manière à permettre la visualisation d'interactions ADN : protéine.

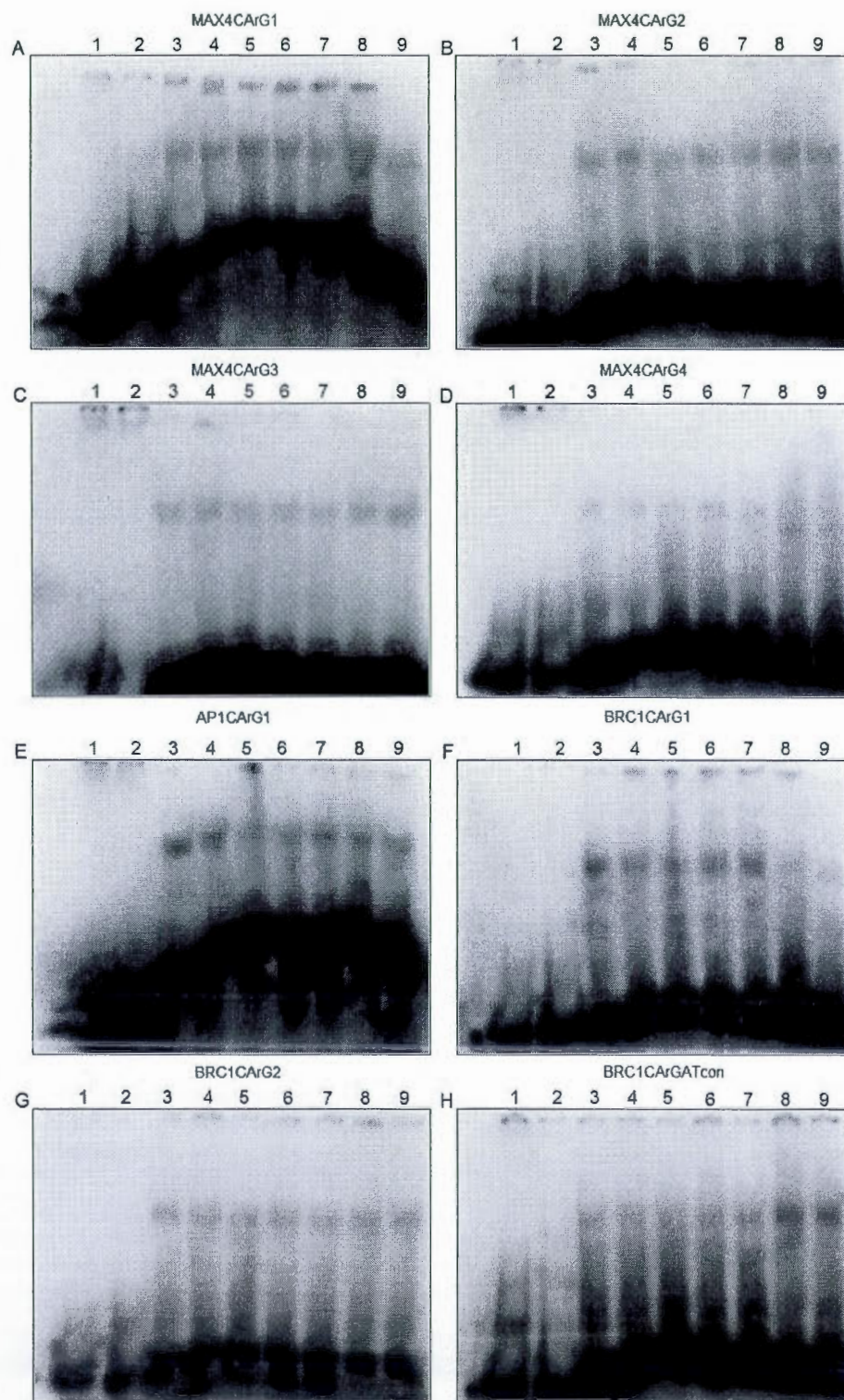


FIGURE 3.10. Retard sur gel des liaisons de TaVRN1 aux différents motifs CArG présents dans les régions promotrices et 5'UTR des gènes *AtMAX4*, *AtAP1* et *AtBRC1*. Les pistes 1 et 2 correspondent à la sonde native et sonde mutante seule, respectivement. Les extraits bruts de bactéries contenant les protéines TaVRN1 ont été incubés avec les sondes ADN radiomarquées ^{32}P natives et mutantes (cf Figure 3.5) correspondant aux motifs CArG (pistes 3 à 9). Les pistes 3 à 5 correspondent à des tests effectués avec des volumes croissants d'extraits protéiques (5, 10 et 15 μL) avec la sonde native radiomarquée. Les pistes 6 et 7 correspondent à la piste 5 additionnée de sondes ADN non marquées (excès de 50X et 100X) utilisées comme compétiteurs. Les pistes 8 et 9 correspondent à des tests effectués avec 15 μL d'extraits protéiques avec respectivement la sonde mutante radiomarquée seule ou en présence de sonde native non marquée (excès de 100X). Les complexes protéine-ADN ont été résolus par PAGE. Les gels séchés ont été exposés à des écrans K-screen (Kodak) pour 24 heures. Le signal a ensuite été détecté avec le système Personal Molecular FX Imager et le programme Quantity One (Bio-Rad).

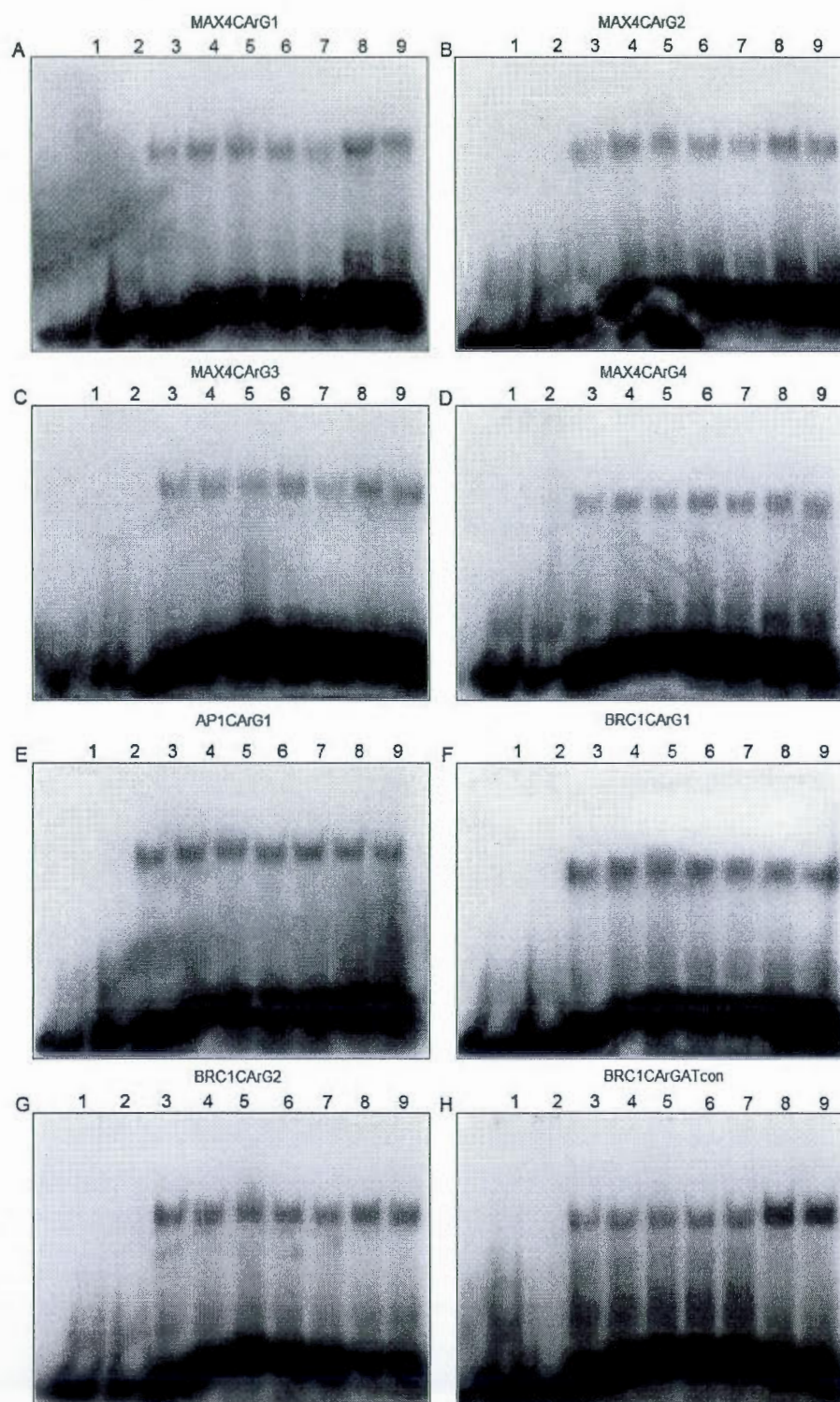


FIGURE 3.11. Retard sur gel des liaisons de AtAP1 aux différents motifs CArG présents dans les régions promotrices et 5'UTR des gènes *AtMAX4*, *AtAP1* et *AtBRC1*. Les pistes 1 et 2 correspondent à la sonde native et sonde mutante seule, respectivement. Les extraits bruts de bactéries contenant les protéines TaVRN1 ont été incubés avec les sondes ADN radiomarquées ^{32}P natives et mutantes (cf Figure 3.5) correspondant aux motifs CArG (pistes 3 à 9). Les pistes 3 à 5 correspondent à des tests effectués avec des volumes croissants d'extraits protéiques (5, 10 et 15 μL) avec la sonde native radiomarquée. Les pistes 6 et 7 correspondent à la piste 5 additionnée de sondes ADN non marquées (excès de 50X et 100X) utilisées comme compétiteurs. Les pistes 8 et 9 correspondent à des tests effectués avec 15 μL d'extraits protéiques avec respectivement la sonde mutante radiomarquée seule ou en présence de sonde native non marquée (excès de 100X). Les complexes protéine-ADN ont été résolus par PAGE. Les gels séchés ont été exposés à des écrans K-screen (Kodak) pour 24 heures. Le signal a ensuite été détecté avec le système Personal Molecular FX Imager et le programme Quantity One (Bio-Rad).

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Lors d'études récentes, il a été déterminé que les strigolactones, des régulateurs de croissance dérivés de caroténoïdes et produits par la voie *MORE AXILLARY BRANCHING (MAX)*, sont des régulateurs négatifs du développement des bourgeons axillaires. Les gènes *AtMAX1* à *AtMAX4* chez *Arabidopsis* codent pour des protéines impliquées dans la synthèse et la régulation de ces molécules (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008; Brewer et al., 2009; Hayward et al., 2009; Crawford et al., 2010; Agusti et al., 2011). Parallèlement, une autre protéine, nommée *BRANCHED1 (AtBRC1)*, est impliquée dans l'arrêt du développement des bourgeons, et il a été suggéré que son action se trouvait en aval de la voie *MAX* (Aguilar-Martinez et al., 2007; Braun et al., 2012). Récemment, une étude a démontré que l'expression constitutive du gène *TRITICUM AESTIVUM VERNALIZATION1 (TaVRN1)* du blé chez *Arabidopsis* affecte la ramification (Adam et al., 2007). Ce gène code pour un facteur de transcription à boîte MADS (MADS TF) qui se lie à des motifs CArG de la région promotrice de *AtMAX4*, et provoque une augmentation de l'expression de *AtMAX4*. *TaVRN1* fait partie du clade AP1/SQUA, tout comme les gènes *AtAP1* et *AtFUL* chez la plante-modèle *Arabidopsis*. Les régulateurs de croissance ont donc un impact direct sur le développement et la croissance des plantes, ce qui affecte la biomasse et le rendement des cultures. Un des facteurs déterminants de la biomasse est l'étendue de la ramification. Déterminer si *AtAP1* et *AtFUL* sont des orthologues de *TaVRN1* qui sont impliquées dans la ramification et identifier leurs cibles devient alors essentiel.

Motifs CArG

Chez les plantes supérieures, il a été démontré que les facteurs de transcription à domaine MADS se lient à des motifs CArG situés dans les promoteurs de leurs gènes cibles. De façon générale, le cœur de la séquence consensus d'un motif CArG est CC(A/T)₆GG (Minty et Kedes, 1986; Pollock et Treisman, 1991). L'établissement de cette séquence consensus provient d'analyses de séquences d'ADN génomique obtenues de différents eucaryotes, et de fragments d'ADN synthétique testés dans des expériences de retard sur gel. Cependant, chez les plantes supérieures, différentes analyses ont montré que des facteurs de transcription à boîte MADS avaient une plus grande affinité pour des motifs légèrement différents (Shore et Sharrocks, 1995; de Folter et Angenent, 2006). Ainsi certaines de ces protéines, tel que AGL15, ont montré une plus grande affinité pour des motifs CArG de type C(A/T)₈G. De plus, ces études suggèrent que les nucléotides entourant le motif CArG peuvent jouer un rôle dans la spécificité de reconnaissance du site de liaison.

Dans l'étude actuelle, l'analyse des régions promotrices et 5'UTR des gènes *AtAP1*, *AtBRC1*, *AtMAX2* et *AtMAX4* a permis de déceler de nombreux motifs CArG ainsi qu'un motif CArG consensus. La présence de tels motifs dans le promoteur de *AtAP1*, qui code pour une protéine à boîte MADS, suggère la possibilité que cette dernière puisse exercer un contrôle transcriptionnel sur sa propre expression. Ceci n'est pas surprenant puisque les protéines à boîte MADS sont connues pour avoir des mécanismes d'autorégulation ou être régulées par d'autres protéines de la famille MADS (Schwarz-Sommer et al., 1992; Goto et Meyerowitz, 1994; Becskei et Serrano, 2000; de Folter et al., 2005; Gomez-Mena et al., 2005; Zhu et Perry, 2005). D'ailleurs, les analyses de retard sur gel montrent qu'*AtAP1* autant que *TaVRN1* sont capables d'interagir avec le motif *AtAP1* CArG1 (Figures 3.10 et 3.11). Chez les gènes *AtBRC1*, *AtMAX2* et *AtMAX4*, la présence de ces motifs dans leur promoteur

signifie que ces gènes sont potentiellement régulés par des facteurs de transcription à boîte MADS (de Folter et Angenent, 2006). Les résultats obtenus par retard sur gel suggèrent aussi une telle interaction.

Production de protéines recombinantes

La production de protéines recombinantes pour des facteurs de transcription à boîte MADS dans un système bactérien comporte quelques avantages. Ces facteurs de transcription, et donc leurs motifs cible, ne sont présents que chez les eucaryotes (de Folter et Angenent, 2006). Le risque d'interaction avec l'ADN de l'hôte bactérien est donc diminué. Un second avantage est le rendement potentiel de ce système, puisque l'expression de protéines recombinantes peut atteindre jusqu'à 80% du poids sec de la cellule hôte (Demain et Vaishnav, 2009). De plus, le faible coût de production de cette méthode ainsi que la rapidité de production contribue à faire de ce système une option avantageuse (Demain et Vaishnav, 2009).

Concernant les analyses d'expression, le fait que la majeure partie des protéines recombinantes induites se situe dans les corps d'inclusion de la bactérie suggère que les protéines recombinantes AtAPI1, AtFUL et TaVRN1 sont soit nocives pour les *E. coli* TOP10 employées, qui les envoient rapidement dans les corps d'inclusion, ou que la production des protéines rencontre un obstacle limitant sa solubilité.

Lors des analyses d'induction, les protéines d'intérêt étant majoritairement insolubles à 37°C pour 1 mM d'IPTG, nous avons abaissé la température du milieu de culture ainsi que la concentration d'inducteur puisque ceci pourrait avoir un impact autant sur la production que sur leur repliement. En effet, il a été démontré que de moduler la température permet à certaines protéines d'adopter une bonne conformation ou d'éviter leur dégradation (Sivashanmugam et al., 2009). De plus, diminuer la vitesse à

laquelle celles-ci sont produites aurait pu permettre à la bactérie de mieux solubiliser celles-ci. Lorsque des protéines n'arrivent pas à obtenir leur conformation native, elles s'agrègent et forment des corps d'inclusion ou se dégradent (Baneyx et Mujacic, 2004). Il est possible que des modifications post-traductionnelles soient nécessaires pour la maturation de certaines protéines, dont celles testées dans la présente étude. L'incapacité d'organismes tel *E. coli* à faire ces modifications pourrait expliquer la faible production de protéines stables et solubles. En outre, l'impossibilité de former des ponts disulfures intramoléculaires stables dans le cytoplasme d'*E. coli* est une hypothèse pouvant expliquer l'insolubilité des protéines AtAP1, AtFUL et TaVRN1. Puisque celles-ci contiennent de nombreux résidus méthionine et cystéine, il est possible qu'elles soient trop rapidement réduites par l'action combinée des thiorédoxines et des glutarédoxines (Ritz et Beckwith, 2001). Afin de vérifier cette hypothèse, la séquence des trois protéines recombinantes a été évaluée à l'aide de dbPTM, un programme d'estimation statistique de modifications post-traductionnelles (Lee et al., 2006). Cette vérification a montré qu'il n'y a pas de modification post-traductionnelle prédite, hormis une phosphorylation sur quelques résidus sérine pour AtFUL. Toutefois, cette hypothèse reste à vérifier expérimentalement. Une autre solution adoptée pour améliorer le rendement de production a été d'augmenter les concentrations bactériennes avant induction, de DO₆₀₀ 0,8 à 1,2 (données non présentées). Même si des DO₆₀₀ de 8 à 14 ont déjà été démontrées comme utilisables pour les inductions de protéines recombinantes, cette solution a toutefois ses limites puisqu'une trop forte augmentation engendre une acidification du milieu de culture et limite la disponibilité de l'oxygène, ce qui ralentit ou même arrête la division cellulaire (Studier, 2005). Une trop grande concentration en bactéries augmente aussi l'activité des bêta-lactamases ce qui favorise la dégradation de la carbénicilline. Une diminution de la concentration de cet antibiotique dans le milieu augmente la prolifération de bactéries dépourvues de plasmide, ce qui diminue le niveau de protéines recombinantes produites par rapport

au niveau de protéines totales du milieu (Studier, 2005; Sivashanmugam et al., 2009). De plus, afin d'éviter le manque de substrats, il devient alors nécessaire de prévoir des milieux de culture enrichis ainsi qu'une plus grande concentration d'inducteur lors de l'induction. Dans l'étude actuelle, le niveau de croissance n'ayant été que sensiblement augmenté, une simple hausse de la concentration de l'antibiotique de 50 à 60 $\mu\text{g/mL}$ a permis de compenser pour la dégradation de l'antibiotique et d'augmenter sensiblement le rendement.

D'autres possibilités d'optimisation permettant d'augmenter le rendement des protéines recombinantes auraient été de contrôler le pH du milieu de culture ou de changer le vecteur de production. La modulation du pH du milieu peut permettre d'augmenter le niveau de production et diminuer la dégradation des protéines d'intérêt. Bien que le pH affecte la production de protéines recombinantes, la variation de pH est un facteur généralement moins important que le temps d'induction (Sivashanmugam et al., 2009). Quant au niveau de dégradation de l'antibiotique, le fait d'avoir augmenté la concentration de carbénicilline réduit sensiblement ce risque. Pour ce qui est de la production dans un autre vecteur d'expression, cette solution aurait effectivement été possible notamment avec des vecteurs tel que pXCK-K et pXCK-EL permettant de produire une protéine recombinante à queue-6His coexprimant les protéines chaperonnes DnaK et GroEL (Kyratsous et al., 2009). Ces vecteurs sont reconnus pour favoriser le repliement des protéines recombinantes co-exprimées. Une autre possibilité de vecteur d'expression, serait un plasmide permettant d'ajouter une protéine fusion MBP (maltose-binding protein), favorisant la solubilisation de protéines recombinantes, tel que les plasmides pAB-MBP et pAB-6His-MBP (Fox et al., 2003; Fox et Waugh, 2003; Raran-Kurussi et Waugh, 2012). Toutefois, il aurait fallu procéder à de nouveaux clonages ainsi qu'à la réoptimisation de l'expression de ces nouveaux vecteurs, sans nécessairement garantir un meilleur rendement ou une toxicité moindre des protéines.

Une alternative aurait pu être de produire ces protéines avec un autre système de production soit, par exemple, un système impliquant des levures ou par production dans un système acellulaire *in vitro*. La production des protéines d'intérêt dans *Saccharomyces cerevisiae* ou *Pichia pastoris* a d'ailleurs de nombreux avantages. Les levures étant des eucaryotes, celles-ci ont la capacité d'effectuer davantage de modifications post-traductionnelles (Cereghino et al., 2002). Ceci aurait permis de limiter la possibilité d'insolubilité due à la maturation des protéines. Toutefois, il a été démontré que certaines modifications, notamment les ponts disulfures, sont effectuées plus lentement chez la levure, ce qui peut ralentir la synthèse des protéines recombinantes (Porro et al., 2005). Un autre avantage des levures consiste en la sécrétion des protéines recombinantes lorsque celles-ci sont fusionnées à un peptide signal (Achstetter et al., 1992). Ainsi, même si les rendements sont inférieurs, cette possibilité réduit les impuretés ainsi que les risques de dégradation associés à la lyse des levures. Cependant, il a été démontré que *S. cerevisiae* pouvait difficilement sécréter des protéines de taille supérieure à 30 kDa, celles-ci étant retenues dans le cytoplasme (Schmidt, 2004). Une autre possibilité aurait été d'intégrer le gène des protéines recombinantes directement dans le génome de *P. pastoris*, ce qui augmente la stabilité de l'expression des protéines (Orr-Weaver et al., 1981). Étant méthylotrophe, cette levure utilise le méthanol comme source de carbone, ce qui peut réduire le risque de contamination de la culture. De plus, il est possible d'insérer le transgène sous le contrôle de promoteurs inducible au méthanol *AOX1* et *AOX2*. Par contre, *P. pastoris* produit très peu de protéines chaperones (Demain et Vaishnav, 2009) ce qui augmente le risque de mauvaise conformation des protéines. Qui plus est, la production chez la levure, aussi avantageuse qu'elle soit, aurait nécessité plusieurs mois d'optimisation. Enfin, concernant la production de protéines *in vitro*, même si ce procédé élimine la possibilité de corps d'inclusion, ce système de production est onéreux et le rendement est relativement faible

(<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=4E53C1E3-5056-8A76-4E0E-DA9DEC1400D1> consulté avril 2013) (Asahara et Chong, 2010).

Purification des protéines recombinantes

Lors de cette étude, de nombreuses méthodes de purification ont été testées. Tout d'abord, comme une portion non négligeable des protéines produites était dans la fraction soluble des bactéries, la première méthode de purification employée a été une purification native sur colonne NiNTA. En théorie, une purification de ce type est plutôt simple : faisant usage de l'affinité pour le nickel de la queue poly-histidine ajoutée par le vecteur d'expression pTrcHis, les protéines d'intérêt sont retenues dans la colonne puis éluées par l'ajout progressif d'imidazole. Ceci est possible puisque l'imidazole a plus d'affinité pour le nickel que l'histidine. Or, puisque la totalité des protéines recombinantes éluait sans imidazole, il a été hypothétisé que la conformation des protéines rendait difficile l'accès à la queue poly-histidine, empêchant ainsi une interaction avec le nickel de la résine. Pour remédier à cette situation et augmenter en même temps la quantité de protéines à purifier, une méthode de purification dénaturante sur colonne NiNTA a été choisie. Ainsi, les protéines d'intérêt, dénaturées par une forte concentration d'urée, sont séparées sur la colonne, où leur queue histidine est retenue par interaction avec le nickel de la résine. Les protéines sont ensuite éluées par acidification progressive des tampons éluant dans la colonne, modifiant la charge des protéines d'intérêt et réduisant l'affinité pour la résine. Étant dénaturées, les protéines recombinantes ont ainsi pu être purifiées, supportant l'idée que la conformation des protéines natives rend probablement la queue histidine inaccessible pour la liaison à la résine. Toutefois, puisque les protéines à l'étude sont des facteurs de transcription, l'étape de renaturation pose un problème majeur. En temps normal, les protéines séparées de manière dénaturante à l'urée sont renaturées par dialyses successives afin d'éliminer l'urée (l'agent

dénaturant). Pour des protéines ayant une activité enzymatique, il est aisé de déterminer si les protéines sont bien renaturées, simplement en comparant l'activité présente dans l'extrait brut comparativement aux protéines purifiées aux différentes étapes de dialyses. Dans le cas présent, la seule vérification possible consistait à procéder à des analyses de retard sur gel. Or, bien que cette vérification fut exécutée pour chacune des protéines (données non présentées), celle-ci comporte toutefois un problème. Il n'est pas possible, hormis empiriquement, de déterminer si une absence d'interaction est en lien avec la renaturation des protéines ou si les conditions d'interaction entre les protéines et les différents ADN cible ne sont pas adéquates. Ainsi, même si une mauvaise renaturation demeure une possibilité et que certaines compagnies telle que Pierce, AthenaES et Millipore vendent des trousse de renaturation, cette approche a finalement été écartée en raison des coûts encourus et du temps nécessaire à une telle entreprise.

Bénéficiant de l'arrivée d'un système de purification BioLogic Duoflow de Bio Rad dans notre laboratoire, une quatrième et une cinquième méthode de purification ont été mises au point. Ces deux méthodes ont été exécutées sur colonne à échange d'anion fort UNO Q1 (données non présentées). La première méthode élaborée était une méthode classique de purification par ajout progressif de sel NaCl pour éluer les protéines attachées. Cette purification a permis de purifier dans une certaine mesure la protéine TaVRT1. Toutefois les quantités obtenues étaient faibles en raison de dégradation, malgré des efforts d'optimisation. La seconde méthode élaborée est une méthode de purification alliant des phases d'ajouts progressifs de sel ainsi qu'une modulation du pH permettant d'améliorer d'une part la liaison à la résine, et d'autre part une dissociation plus spécifique des protéines. Or, il n'en demeure pas moins que la majorité des protéines produites se dégradaient dans le temps nécessaire pour localiser les fractions chromatographiques contenant les protéines d'intérêt, malgré l'ajout de PMSF, un inhibiteur de protéases.

Plusieurs autres méthodes de purification auraient pu être envisagées, tel que précipitation au sulfate d'ammonium ou purification à l'aide d'une colonne cationique. Par contre, les contraintes de temps ont fait en sorte qu'on a dû se résoudre à utiliser des échantillons bruts de protéines bactériennes, tel que ce qui a été fait dans des études précédentes (Adam et al., 2007). Nous avons donc procédé aux analyses de retard sur gel à partir d'extraits bruts des différents clones induits avec 1 mM d'IPTG pour des temps de 2 heures et additionnés de PMSF.

Analyse de retard sur gel

Tel que cité précédemment, l'analyse des régions promotrices des gènes *AtAPI*, *AtBRC1*, *AtMAX2* et *AtMAX4* a permis de détecter de nombreux motifs d'attachement CArG. De ces motifs, certains ont été exclus en raison de leur grande distance en amont de l'ATG. Toutefois, bien que les motifs *AtAPI* CArG1, et *AtMAX4* CArG3 et CArG4 ne soient pas dans la région proximale (800 pb) des régions promotrices, ces motifs ont quand même été retenus pour fins de contrôle puisqu'une interaction pour certains de ces motifs avait déjà été démontrée dans une autre étude (Adam et al., 2007). Des expériences de retard sur gel ont été effectuées avec les protéines *AtAPI*, *AtFUL* et *TaVRN1* sur des sondes générées avec des oligonucléotides synthétiques avec ou sans mutation. En principe, on s'attend à voir des bandes d'ADN subissant un retard de migration sur gel natif lorsque la protéine interagit avec la sonde, et aucune bande lorsqu'il n'y a pas d'interaction. Seules les analyses de retard sur gel des protéines recombinantes *AtAPI* et *TaVRN1* ont permis de visualiser des interactions ADN : protéines.

Dans la présente étude, des analyses de retard sur gel ont donc été effectuées avec des sondes natives et des sondes mutées. Contrairement aux attentes, des retards sur gel ont aussi été observés avec les motifs CArG mutés. D'ailleurs, il est possible de

remarquer que l'interaction pour les sondes des motifs mutés CArG1-mut de *AtMAX4* et CArG2-mut et CArGATconsensus-mut de *AtBRC1* semble plus forte que pour les motifs natifs. En théorie, les facteurs de transcription MADS sont relativement spécifiques aux motifs CArG. Or chez les plantes supérieures, il a été démontré que certaines altérations aux motifs pouvaient être apportées sans pour autant inhiber l'interaction des protéines aux motifs (de Folter et Angenent, 2006). D'ailleurs, des analyses chez *Arabidopsis* ont montré que les facteurs de transcription à boîte MADS pouvaient interagir avec des motifs considérés comme non-CArG (Sablowski et Meyerowitz, 1998). Il est alors possible de supposer que les interactions observées avec les motifs mutés ne soient pas des artefacts. D'autre part, il est possible que l'interaction de TaVRN1 et AtAP1 avec les motifs CArG mutés puisse s'expliquer du fait que la mutation n'est peut-être pas suffisante, n'étant que de deux paires de bases au milieu du motif. Il se peut aussi que l'interaction pour ces motifs en particulier est si forte que le niveau de compétiteur employé soit insuffisant même pour les motifs ayant une mutation. Une autre possibilité pourrait être que l'interaction perçue soit non spécifique, mais cette option est toutefois peu probable puisque le milieu de réaction de l'expérimentation contient du poly-dIdC, un compétiteur non spécifique. L'autre fait qui suggère que les interactions observées soient spécifiques est qu'AtAP1 et TaVRN1 n'ont pas des patrons d'interactions identiques tels que pour les motifs CArG4 de *AtMAX4* et CArG1 de *AtBRC1*. Les interactions ne semblent donc pas provenir de protéines autres que les protéines d'intérêt. D'ailleurs, des analyses de retards sur gel effectuées à partir de clones contenant le vecteur pTrcHis B sans insert ont montré que l'interaction avec les motifs CArG ne provient pas de protéines d'*E. coli* (Adam et al., 2007).

Les expériences de retard sur gel ont montré des interactions de TaVRN1 avec certains motifs pour lesquels Adam et al. (2007) n'ont pas observé d'interaction. La première hypothèse vis-à-vis un tel résultat est que les conditions de liaison de la

présente étude comparativement à l'étude précédente ne sont pas identiques. Deux possibilités pourraient expliquer pareille situation : soit les conditions de la présente étude ne sont pas suffisamment stringentes, réduisant ainsi la spécificité des interactions, ou soit la quantité de protéines incubées avec les sondes est supérieure en proportion à la dernière étude, favorisant les interactions non-spécifiques. Entre ces deux possibilités, la première semble plus logique puisque pour les deux protéines ayant été optimisées, on remarque que celles-ci semblent pouvoir interagir, dans une certaine mesure, avec la totalité des motifs à l'étude. Ce genre de résultats a d'ailleurs été observé lors d'études précédentes à partir de séquences CARG artificielles (Pollock et Treisman, 1990; Huang et al., 1993). Une autre possibilité pouvant affecter la spécificité de liaison vient de la synthèse des protéines recombinantes. Ainsi, des études précédentes ont montré que des extensions C et N-terminales pouvaient nuire à la spécificité de liaisons protéine : protéine et ADN : protéine (Shore et Sharrocks, 1995).

De plus, les analyses de retard sur gel permettent d'observer qu'AtAP1 est capable d'interagir avec sa propre région promotrice. Ce genre d'interaction suggère qu'AtAP1 a la capacité de s'autoréguler. Chez les gènes MADS de plantes supérieures, les mécanismes d'autorégulation ne sont pas un phénomène rare (de Folter et Angenent, 2006). Il serait alors intéressant de confirmer *in vivo* cette observation par immunoprécipitation de chromatine (ChIP) ou à l'aide de mutants surexprimant AtAP1 en évaluant le niveau d'expression des ARNm et des protéines comparativement à des plantes de type sauvage.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES FUTURES

En résumé, mes travaux suggèrent que la protéine AtAP1 pourrait être un orthologue de TaVRN1 chez *Arabidopsis* puisque celle-ci est capable de se lier avec les mêmes motifs que TaVRN1. De plus, le fait que ces deux facteurs de transcription soient capables d'interagir avec les différents motifs CArG montre qu'*AtAP1*, *AtBRC1* et *AtMAX4* peuvent être régulées par des facteurs de transcription à boîtes MADS. Pour confirmer ces observations, il serait nécessaire de produire une lignée mutante surexprimant constitutivement AtAP1 afin d'observer les changements phénotypiques causés par cette surexpression et d'analyser par RT-PCR quantitative en temps réel les niveaux d'expression des transcrits comparativement aux plants de type sauvage. Une comparaison avec les lignées surexprimant ectopiquement TaVRN1 de manière constitutive pourrait aussi s'avérer informative.

Bien que les présentes analyses montrent qu'AtAP1 et TaVRN1 interagissent avec des fragments contenant des motifs CArG, il serait intéressant de poursuivre l'optimisation des conditions de liaison, ce qui permettrait de mieux quantifier la spécificité des interactions avec les sondes natives et apporterait des informations additionnelles quant aux interactions avec les sondes mutées. Une étude plus poussée sur les différentes permutations possibles des motifs devra être effectuée afin de mieux connaître les motifs préférés des différents facteurs de transcription. L'élaboration et l'optimisation de nouvelles méthodes de purification et la synthèse de protéines exemptes d'extensions C- et N-terminale serait aussi à prévoir. De plus les protéines AtFUL et AtCAL faisant partie du clade AP1/SQUAMOSA, il serait aussi nécessaire de vérifier si celles-ci peuvent interagir avec les différents motifs CArG à l'étude. De nouvelles sondes contenant des mutations plus importantes pourraient aussi être nécessaires pour démontrer la spécificité des facteurs de transcription à boîte MADS envers les motifs CArG. Des analyses de mutants

déficients en *AtAPI*, *AtFUL*, *AtCAL*, ou double et triple mutants, ou des mutants dont l'expression serait constitutive pour l'un ou l'autre de ces facteurs de transcription permettraient de vérifier au niveau de l'expression des ARNm si ces protéines ont des fonctions redondantes. Ceci pourrait être effectué par induction transcriptionnelle, où les facteurs de transcriptions seraient fusionnés traductionnellement à un récepteur de glucocorticoïdes (Lloyd et al., 1994). Ainsi lors de traitement à la dexaméthasone, le récepteur serait translocalisé du cytoplasme vers le noyau, translocalisant en même temps le facteur de transcription. Les cibles du facteur de transcription pourraient alors être identifiées par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).

À la lueur de ces résultats, un autre type d'analyse à prévoir sera l'étude comparative de plantes de type sauvage et mutante "Knock out" (KO, dont l'expression de gènes est supprimée) et "overexpressed" (OEX, dont l'expression de gènes est surexprimée) pour *AtBRC1*, et *AtAPI* ainsi que de croisements respectifs autant au niveau d'analyses phénotypiques que d'analyses transcriptionnelles. Normalement, on devrait s'attendre à une ramification plus importante chez les plants surexprimant *AtAPI* et diminuée chez les plants surexprimant *AtBRC1*. L'analyse du niveau d'expression des gènes associés au métabolisme des strigolactones sera aussi intéressante, permettant de voir si ces gènes ont un impact direct sur la ramification, ce qui pourrait signifier qu'il existe un lien entre floraison et ramification. Bref, le phénomène qu'est la ramification est un phénomène bien complexe!

RÉFÉRENCES

- Achstetter T, Nguyen-Juilleret M, Findeli A, Merkamm M et Lemoine Y. 1992. «A new signal peptide useful for secretion of heterologous proteins from yeast and its application for synthesis of hirudin». *Gene* 110: 25-31.
- Adam H, Ouellet F, Kane NA, Agharbaoui Z, Major G, Tominaga Y et Sarhan F. 2007. «Overexpression of TaVRN1 in Arabidopsis promotes early flowering and alters development». *Plant and Cell Physiology* 48: 1192-1206.
- Aguilar-Martinez JA, Poza-Carrion C et Cubas P. 2007. «Arabidopsis BRANCHED1 acts as an integrator of branching signals within axillary buds». *The Plant Cell* 19: 458-472.
- Agusti J, Herold S, Schwarz M, Sanchez P, Ljung K, Dun EA, Brewer PB, Beveridge CA, Sieberer T, Sehr EM et Greb T. 2011. «Strigolactone signaling is required for auxin-dependent stimulation of secondary growth in plants». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 20242-20247.
- Alder A, Jamil M, Marzorati M, Bruno M, Vermathen M, Bigler P, Ghisla S, Bouwmeester H, Beyer P et Al-Babili S. 2012. «The path from beta-carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone». *Science* 335: 1348-1351.
- Asahara H et Chong S. 2010. «*In vitro* genetic reconstruction of bacterial transcription initiation by coupled synthesis and detection of RNA polymerase holoenzyme». *Nucleic Acids Research* 38: e141.
- Auldridge ME, Block A, Vogel JT, Dabney-Smith C, Mila I, Bouzayen M, Magallanes-Lundback M, DellaPenna D, McCarty DR et Klee HJ. 2006. «Characterization of three members of the Arabidopsis carotenoid cleavage dioxygenase family demonstrates the divergent roles of this multifunctional enzyme family». *The Plant Journal* 45: 982-993.
- Bainbridge K, Guyomarc'h S, Bayer E, Swarup R, Bennett M, Mandel T et Kuhlmeier C. 2008. «Auxin influx carriers stabilize phyllotactic patterning». *Genes & Development* 22: 810-823.
- Baneyx F et Mujacic M. 2004. «Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*». *Nature Biotechnology* 22: 1399-1408.

- Becker A, Saedler H et Theissen G. 2003. «Distinct MADS-box gene expression patterns in the reproductive cones of the gymnosperm *Gnetum gnemon*». *Development Genes and Evolution* 213: 567-572.
- Becskei A et Serrano L. 2000. «Engineering stability in gene networks by autoregulation». *Nature* 405: 590-593.
- Bender RL, Fekete ML, Klinkenberg PM, Hampton M, Bauer B, Malecha M, Lindgren K, J AM, Perera MA, Nikolau BJ et Carter CJ. 2013. «PIN6 is required for nectary auxin response and short stamen development». *The Plant Journal* 74: 893-904.
- Benamins R, Quint A, Weijers D, Hooykaas P et Offringa R. 2001. «The PINOID protein kinase regulates organ development in Arabidopsis by enhancing polar auxin transport». *Development* 128: 4057-4067.
- Beveridge CA, Ross JJ et Murfet IC. 1996. «Branching in pea (action of genes *Rms3* and *Rms4*)». *Plant Physiology* 110: 859-865.
- Blakeslee JJ, Peer WA et Murphy AS. 2005. «Auxin transport». *Current Opinion in Plant Biology* 8: 494-500.
- Booker J, Auldridge M, Wills S, McCarty D, Klee H et Leyser O. 2004. «MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule». *Current Biology* 14: 1232-1238.
- Booker J, Sieberer T, Wright W, Williamson L, Willett B, Stirnberg P, Turnbull C, Srinivasan M, Goddard P et Leyser O. 2005. «MAX1 encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of MAX3/4 to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone». *Developmental Cell* 8: 443-449.
- Braun N, de Saint Germain A, Pillot JP, Boutet-Mercey S, Dalmais M, Antoniadi I, Li X, Maia-Grondard A, Le Signor C, Bouteiller N, Luo D, Bendahmane A, Turnbull C et Rameau C. 2012. «The pea TCP transcription factor PsBRC1 acts downstream of Strigolactones to control shoot branching». *Plant Physiology* 158: 225-238.
- Brewer PB, Dun EA, Ferguson BJ, Rameau C et Beveridge CA. 2009. «Strigolactone acts downstream of auxin to regulate bud outgrowth in pea and Arabidopsis». *Plant Physiology* 150: 482-493.
- Carter MJ et Milton ID. 1993. «An inexpensive and simple method for DNA purifications on silica particles». *Nucleic Acids Research* 21: 1044.

Cereghino GP, Cereghino JL, Ilgen C et Cregg JM. 2002. «Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*». *Current Opinion in Biotechnology* 13: 329-332.

Ciechanover A, Orian A et Schwartz AL. 2000. «Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction». *Bioessays* 22: 442-451.

Crawford S, Shinohara N, Sieberer T, Williamson L, George G, Hepworth J, Muller D, Domagalska MA et Leyser O. 2010. «Strigolactones enhance competition between shoot branches by dampening auxin transport». *Development* 137: 2905-2913.

Dal Bosco C, Dovzhenko A, Liu X, Woerner N, Rensch T, Eismann M, Eimer S, Hegermann J, Paponov IA, Ruperti B, Heberle-Bors E, Touraev A, Cohen JD et Palme K. 2012. «The endoplasmic reticulum localized PIN8 is a pollen-specific auxin carrier involved in intracellular auxin homeostasis». *The Plant Journal* 71: 860-870.

Dal Bosco C, Dovzhenko A et Palme K. 2012. «Intracellular auxin transport in pollen: PIN8, PIN5 and PILS5». *Plant Signaling & Behavior* 7: 1504-1505.

Danyluk J, Kane NA, Breton G, Limin AE, Fowler DB et Sarhan F. 2003. «TaVRT-1, a putative transcription factor associated with vegetative to reproductive transition in cereals». *Plant Physiology* 132: 1849-1860.

Davidson EH et Erwin DH. 2006. «Gene regulatory networks and the evolution of animal body plans». *Science* 311: 796-800.

de Folter S et Angenent GC. 2006. «*trans* meets *cis* in MADS science». *Trends in Plant Science* 11: 224-231.

de Folter S, Immink RG, Kieffer M, Parenicova L, Henz SR, Weigel D, Busscher M, Kooiker M, Colombo L, Kater MM, Davies B et Angenent GC. 2005. «Comprehensive interaction map of the Arabidopsis MADS Box transcription factors». *The Plant Cell* 17: 1424-1433.

Demain AL et Vaishnav P. 2009. «Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms». *Biotechnology Advances* 27: 297-306.

Dharmasiri N, Dharmasiri S et Estelle M. 2005. «The F-box protein TIR1 is an auxin receptor». *Nature* 435: 441-445.

Dharmasiri S et Estelle M. 2002. «The role of regulated protein degradation in auxin response». *Plant Molecular Biology* 49: 401-409.

Feinberg AP et Vogelstein B. 1984. «A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Addendum». *Analytical Biochemistry* 137: 266-267.

Ferguson BJ et Beveridge CA. 2009. «Roles for auxin, cytokinin, and strigolactone in regulating shoot branching». *Plant Physiology* 149: 1929-1944.

Foo E, Bullier E, Goussot M, Foucher F, Rameau C et Beveridge CA. 2005. «The branching gene *RAMOSUS1* mediates interactions among two novel signals and auxin in pea». *The Plant Cell* 17: 464-474.

Fox JD, Routzahn KM, Bucher MH et Waugh DS. 2003. «Maltodextrin-binding proteins from diverse bacteria and archaea are potent solubility enhancers». *FEBS Letters* 537: 53-57.

Fox JD et Waugh DS. 2003. «Maltose-binding protein as a solubility enhancer». *Methods in Molecular Biology* 205: 99-117.

Friml J, Benkova E, Blilou I, Wisniewska J, Hamann T, Ljung K, Woody S, Sandberg G, Scheres B, Jurgens G et Palme K. 2002. «AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in Arabidopsis». *Cell* 108: 661-673.

Friml J, Wisniewska J, Benkova E, Mendgen K et Palme K. 2002. «Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis». *Nature* 415: 806-809.

Geisler M et Murphy AS. 2006. «The ABC of auxin transport: the role of p-glycoproteins in plant development». *FEBS Letters* 580: 1094-1102.

Gomez-Mena C, de Folter S, Costa MM, Angenent GC et Sablowski R. 2005. «Transcriptional program controlled by the floral homeotic gene *AGAMOUS* during early organogenesis». *Development* 132: 429-438.

Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pages V, Dun EA, Pillot JP, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais JC, Bouwmeester H, Becard G, Beveridge CA, Rameau C et Rochange SF. 2008. «Strigolactone inhibition of shoot branching». *Nature* 455: 189-194.

- Goto K et Meyerowitz EM. 1994. «Function and regulation of the Arabidopsis floral homeotic gene *PISTILLATA*». *Genes & Development* 8: 1548-1560.
- Hayward A, Stirnberg P, Beveridge C et Leyser O. 2009. «Interactions between auxin and strigolactone in shoot branching control». *Plant Physiology* 151: 400-412.
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M et Korenaga T. 1999. «Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999». *Nucleic Acids Research* 27: 297-300.
- Huang H, Mizukami Y, Hu Y et Ma H. 1993. «Isolation and characterization of the binding sequences for the product of the Arabidopsis floral homeotic gene *AGAMOUS*». *Nucleic Acids Research* 21: 4769-4776.
- Ishikawa S, Maekawa M, Arite T, Onishi K, Takamure I et Kyojuka J. 2005. «Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutants of rice». *Plant Cell Physiology* 46: 79-86.
- Johnson X, Bricch T, Dun EA, Goussot M, Haurogne K, Beveridge CA et Rameau C. 2006. «Branching genes are conserved across species. Genes controlling a novel signal in pea are coregulated by other long-distance signals». *Plant Physiology* 142: 1014-1026.
- Jones AM. 1998. «Auxin transport: down and out and up again». *Science* 282: 2201-2203.
- Kleine-Vehn J, Langowski L, Wisniewska J, Dhonukshe P, Brewer PB et Friml J. 2008. «Cellular and molecular requirements for polar PIN targeting and transcytosis in plants». *Molecular Plant* 1: 1056-1066.
- Kreck P, Skupa P, Libus J, Naramoto S, Tejos R, Friml J et Zazimalova E. 2009. «The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters». *Genome Biology* 10: 249.
- Kyratsous CA, Silverstein SJ, DeLong CR et Panagiotidis CA. 2009. «Chaperone-fusion expression plasmid vectors for improved solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*». *Gene* 440: 9-15.
- Lee TY, Huang HD, Hung JH, Huang HY, Yang YS et Wang TH. 2006. «dbPTM: an information repository of protein post-translational modification». *Nucleic Acids Research* 34: D622-627.

Lewis DR, Negi S, Sukumar P et Muday GK. 2011. «Ethylene inhibits lateral root development, increases IAA transport and expression of PIN3 and PIN7 auxin efflux carriers». *Development* 138: 3485-3495.

Ljung K, Bhalerao RP et Sandberg G. 2001. «Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth». *The Plant Journal* 28: 465-474.

Lloyd AM, Schena M, Walbot V et Davis RW. 1994. «Epidermal cell fate determination in Arabidopsis: patterns defined by a steroid-inducible regulator». *Science* 266: 436-439.

Machesky L. 1996. «Plasmid preparations with diatomaceous earth». *Methods in Molecular Biology* 58: 269-272.

McSteen P et Leyser O. 2005. «Shoot branching». *Annual Review of Plant Biology* 56: 353-374.

Minty A et Kedes L. 1986. «Upstream regions of the human cardiac actin gene that modulate its transcription in muscle cells: presence of an evolutionarily conserved repeated motif». *Molecular and Cell Biology* 6: 2125-2136.

Mravec J, Skupa P, Bailly A, Hoyerova K, Krecek P, Bielach A, Petrasek J, Zhang J, Gaykova V, Stierhof YD, Dobrev PI, Schwarzerova K, Rolcik J, Seifertova D, Luschnig C, Benkova E, Zazimalova E, Geisler M et Friml J. 2009. «Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter». *Nature* 459: 1136-1140.

Nordstrom A, Tarkowski P, Tarkowska D, Norbaek R, Astot C, Dolezal K et Sandberg G. 2004. «Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 8039-8044.

Ongaro V et Leyser O. 2008. «Hormonal control of shoot branching». *Journal of Experimental Botany* 59: 67-74.

Orr-Weaver TL, Szostak JW et Rothstein RJ. 1981. «Yeast transformation: a model system for the study of recombination». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78: 6354-6358.

Paponov IA, Teale WD, Trebar M, Blilou I et Palme K. 2005. «The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives». *Trends in Plant Science* 10: 170-177.

Petrasek J, Mravec J, Bouchard R, Blakeslee JJ, Abas M, Seifertova D, Wisniewska J, Tadele Z, Kubes M, Covanova M, Dhonukshe P, Skupa P, Benkova E, Perry L, Krecek P, Lee OR, Fink GR, Geisler M, Murphy AS, Luschnig C, Zazimalova E et Friml J. 2006. «PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux». *Science* 312: 914-918.

Pollock R et Treisman R. 1990. «A sensitive method for the determination of protein-DNA binding specificities». *Nucleic Acids Research* 18: 6197-6204.

Pollock R et Treisman R. 1991. «Human SRF-related proteins: DNA-binding properties and potential regulatory targets». *Genes & Development* 5: 2327-2341.

Porro D, Sauer M, Branduardi P et Mattanovich D. 2005. «Recombinant protein production in yeasts». *Molecular Biotechnology* 31: 245-259.

Prasad TK, Li X, Abdel-Rahman AM, Hosokawa Z, Cloud NP, Lamotte CE et Cline MG. 1993. «Does auxin play a role in the release of apical dominance by shoot inversion in *Ipomoea nil*?». *Annals of Botany* 71: 223-229.

Prestridge DS. 1991. «SIGNAL SCAN: a computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements». *Computer Applications in the Biosciences* 7: 203-206.

Prusinkiewicz P, Crawford S, Smith RS, Ljung K, Bennett T, Ongaro V et Leyser O. 2009. «Control of bud activation by an auxin transport switch». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 17431-17436.

Raran-Kurussi S et Waugh DS. 2012. «The ability to enhance the solubility of its fusion partners is an intrinsic property of maltose-binding protein but their folding is either spontaneous or chaperone-mediated». *PLoS One* 7: e49589.

Ritz D et Beckwith J. 2001. «Roles of thiol-redox pathways in bacteria». *Annual Review of Microbiology* 55: 21-48.

Sablowski RW et Meyerowitz EM. 1998. «A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes *APETALA3/PISTILLATA*». *Cell* 92: 93-103.

Salmon J, Ramos J et Callis J. 2008. «Degradation of the auxin response factor ARF1». *The Plant Journal* 54: 118-128.

Sauer M, Balla J, Luschnig C, Wisniewska J, Reinohl V, Friml J et Benkova E. 2006. «Canalization of auxin flow by Aux/IAA-ARF-dependent feedback regulation of PIN polarity». *Genes & Development* 20: 2902-2911.

Schmidt FR. 2004. «Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry». *Applied Microbiology and Biotechnology* 65: 363-372.

Schwartz SH, Qin X et Loewen MC. 2004. «The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from *Arabidopsis* indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching». *The Journal of Biological Chemistry* 279: 46940-46945.

Schwarz-Sommer Z, Hue I, Huijser P, Flor PJ, Hansen R, Tetens F, Lonnig WE, Saedler H et Sommer H. 1992. «Characterization of the *Antirrhinum* floral homeotic MADS-box gene *deficiens*: evidence for DNA binding and autoregulation of its persistent expression throughout flower development». *The EMBO Journal* 11: 251-263.

Shore P et Sharrocks AD. 1995. «The MADS-box family of transcription factors». *European Journal of Biochemistry* 229: 1-13.

Simons JL, Napoli CA, Janssen BJ, Plummer KM et Snowden KC. 2007. «Analysis of the *DECREASED APICAL DOMINANCE* genes of *petunia* in the control of axillary branching». *Plant Physiology* 143: 697-706.

Sivashanmugam A, Murray V, Cui C, Zhang Y, Wang J et Li Q. 2009. «Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*». *Protein Science* 18: 936-948.

Snowden KC, Simkin AJ, Janssen BJ, Templeton KR, Loucas HM, Simons JL, Karunairetnam S, Gleave AP, Clark DG et Klee HJ. 2005. «The *Decreased apical dominance1/Petunia hybrida CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8* gene affects branch production and plays a role in leaf senescence, root growth, and flower development». *The Plant Cell* 17: 746-759.

Sorefan K, Booker J, Haurogne K, Goussot M, Bainbridge K, Foo E, Chatfield S, Ward S, Beveridge C, Rameau C et Leyser O. 2003. «*MAX4* and *RMS1* are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in *Arabidopsis* and pea». *Genes & Development* 17: 1469-1474.

Stirnberg P, Chatfield SP et Leyser HMO. 1999. «AXR1 acts after lateral bud formation to inhibit lateral bud growth in Arabidopsis». *Plant Physiology* 121: 839-847.

Stirnberg P, Furner IJ et Leyser HMO. 2007. «MAX2 participates in an SCF complex which acts locally at the node to suppress shoot branching». *The Plant Journal* 50: 80-94.

Stirnberg P, van De Sande K et Leyser HM. 2002. «MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in Arabidopsis». *Development* 129: 1131-1141.

Studier FW. 2005. «Protein production by auto-induction in high density shaking cultures». *Protein Expression and Purification* 41: 207-234.

Tanaka M, Takei K, Kojima M, Sakakibara H et Mori H. 2006. «Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance». *The Plant Journal* 45: 1028-1036.

Titapiwatanakun B, Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Yang H, Mravec J, Sauer M, Cheng Y, Adamec J, Nagashima A, Geisler M, Sakai T, Friml J, Peer WA et Murphy AS. 2009. «ABCB19/PGP19 stabilises PIN1 in membrane microdomains in Arabidopsis». *The Plant Journal* 57: 27-44.

Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, Kyoizuka J et Yamaguchi S. 2008. «Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones». *Nature* 455: 195-200.

Verrier PJ, Bird D, Burla B, Dassa E, Forestier C, Geisler M, Klein M, Kolukisaoglu U, Lee Y, Martinoia E, Murphy A, Rea PA, Samuels L, Schulz B, Spalding EJ, Yazaki K et Theodoulou FL. 2008. «Plant ABC proteins--a unified nomenclature and updated inventory». *Trends in plant science* 13: 151-159.

Waters MT, Brewer PB, Bussell JD, Smith SM et Beveridge CA. 2012. «The Arabidopsis ortholog of rice DWARF27 acts upstream of MAX1 in the control of plant development by strigolactones». *Plant Physiology* 159: 1073-1085.

Waters MT, Nelson DC, Scaffidi A, Flematti GR, Sun YK, Dixon KW et Smith SM. 2012. «Specialisation within the DWARF14 protein family confers distinct responses to karrikins and strigolactones in Arabidopsis». *Development* 139: 1285-1295.

Woo HR, Chung KM, Park JH, Oh SA, Ahn T, Hong SH, Jang SK et Nam HG. 2001. «ORE9, an F-box protein that regulates leaf senescence in Arabidopsis». *The Plant Cell* 13: 1779-1790.

Yang H et Murphy AS. 2009. «Functional expression and characterization of Arabidopsis ABCB, AUX 1 and PIN auxin transporters in *Schizosaccharomyces pombe*». *The Plant Journal* 59: 179-191.

Zazimalova E, Krecek P, Skupa P, Hoyerova K et Petrasek J. 2007. «Polar transport of the plant hormone auxin - the role of PIN-FORMED (PIN) proteins». *Cellular and Molecular Life Sciences* 64: 1621-1637.

Zazimalova E, Murphy AS, Yang H, Hoyerova K et Hosek P. 2013. «Auxin transporters--why so many?». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2: a001552.

Zhu C et Perry SE. 2005. «Control of expression and autoregulation of AGL15, a member of the MADS-box family». *The Plant Journal* 41: 583-594.

Zou J, Zhang S, Zhang W, Li G, Chen Z, Zhai W, Zhao X, Pan X, Xie Q et Zhu L. 2006. «The rice *HIGH-TILLERING DWARF1* encoding an ortholog of Arabidopsis MAX3 is required for negative regulation of the outgrowth of axillary buds». *The Plant Journal* 48: 687-698.